

Aus der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Detlef K. Bartsch
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg



**Peritumorale Entzündung, chronische Pankreatitis und
Chemoresistenz von Gemcitabin bei der Therapie des
Pankreaskarzinoms – Evaluation am
transgenen Tumormausmodell**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps- Universität Marburg
vorgelegt von

Richard F. Knoop

aus Kassel

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am 8. August 2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Volker Fendrich

1. Korreferent: PD Dr. Wolfgang Meißner

2. Korreferent: Prof. Dr. Thomas M. Gress

Meiner Familie

Uta und Prof. Dr. Ulrich Knoop

Franziska, Hannah, Jonathan und Ludwig Knoop

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom – Überblick.....	1
1.2 Risikofaktoren für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms	3
1.3 Molekulare Ursachen des Pankreaskarzinoms.....	4
1.3.1 Das K-ras-Proto-Onkogen	4
1.3.2 Das Tumorsuppressor-Gen p53	5
1.4 Personalisierte Medizin	7
1.5 Inflammation, SIRS und Tumorgenese.....	7
1.6 Systemische Entzündung und prognostische Marker	9
1.6.1 Das C-reaktive Protein	9
1.6.2 Interleukin-1 α	10
1.6.3 Interleukin-6.....	11
1.6.4 STAT3	11
1.6.5 NF κ B	12
1.7 Entzündung und Chemotherapieversagen.....	13
1.8 Transgene Tumormausmodelle	14
1.9 Das Pankreaskarzinom im transgenen Tumormausmodell	16
1.10 Gemcitabin im transgenen Tumormausmodell	17
1.11 Die Pankreatitis im Tumormausmodell	18
1.12 Zielsetzung.....	18
1.13 Fragestellung.....	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Materialien.....	20
2.1.1 Mauslinie	20
2.1.2 Zelllinie	20
2.1.3 Medikamente und Behandlungsreagenzien	20
2.1.4 Geräte und Zubehör.....	20
2.1.5 Gebrauchswaren.....	21
2.1.6 Chemikalien	22
2.1.7 Enzyme und Nukleotide	23
2.1.8 Puffer	23
2.1.9 Stammlösungen.....	23
2.1.10 Antikörper und Konjugate.....	24
2.1.10.1 Primäre Antikörper.....	24

2.1.10.2	Sekundäre Antikörper	24
2.1.10.3	Sekundäre Konjugate	24
2.1.11	PCR-Primer	24
2.1.12	Gebrauchsfertige Systeme	25
2.1.13	Sterilisation von Materialien	25
2.1.14	Software.....	25
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Maus-Genotypisierung.....	26
2.2.1.1	DNA-Extraktion aus Mausmaterial	26
2.2.1.2	Polymerasekettenreaktion	26
2.2.1.3	Anwendung der PCR.....	27
2.2.1.4	Das Agarosegel.....	28
2.2.1.5	Gelelektrophorese und PCR-Auswertung	29
2.2.2	Tierversuche.....	29
2.2.2.1	Zucht und Haltung der Versuchstiere	29
2.2.2.2	Versuchsplan.....	30
2.2.2.3	Ablauf der intraperitonealen Injektionen	31
2.2.2.4	Organ- und Blutentnahme.....	31
2.2.3	Gewebeverarbeitung und Erstellen histologischer Schnitte	32
2.2.4	Färbungen.....	32
2.2.4.1	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	32
2.2.4.2	Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner.....	32
2.2.4.3	Immunohistochemie-Färbungen	32
2.2.4.3.1	Indirekte Methode	33
2.2.4.3.2	Durchführung der immunohistochemischen Färbungen	33
2.2.5	Blutserumanalysen.....	34
2.2.5.1	ELISA	34
2.2.5.2	Partikelbasierte FACS-Assays.....	35
2.2.5.3	Durchführung des ELISAs CRP und der FACS-Assays IL-1 α , IL-6 sowie IL-10, Interferon- γ und Macrophage Inflammatory Protein-1 α	35
2.2.6	Analyse der STAT3-Phosphorylierung durch Interleukin-6 in vitro	36
2.2.7	Statistik.....	36
3.	Ergebnisse	38
3.1	Die Zucht der Mäuse führt zum gewünschten Genotyp	38
3.2	Der Genotyp Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+} induziert makroskopisch sichtbare invasive Pankreaskarzinome	39
3.3	Der Genotyp Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+} induziert mikroskopisch nachweisbare invasive Pankreaskarzinome	40

3.4	Das Gesamtüberleben nach Gruppen: unter milder chronischer Pankreatitis geht der Nutzen einer Gemcitabin-Therapie verloren.....	41
3.5	Evaluation der chronischen Caerulein-induzierten Pankreatitis.....	44
3.5.1	Die chronische Caerulein-Pankreatitis ist histologisch nachweisbar	44
3.5.1.1	Hämatoxylin-Eosin- und Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	44
3.5.2	Die chronische Caerulein-Pankreatitis ist serologisch nachweisbar.....	47
3.5.2.1	IL-1 α , IL-6 und CRP zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen....	47
3.5.2.2	IL-10, Interferon- γ und Macrophage Inflammatory Protein-1 α	49
3.6	Interleukin-6 und PaCa44-Zellen bei Gemcitabin-Exposition in vitro	49
3.7	Interleukin-6 induziert STAT3-Phosphorylierung in vitro	49
3.8	Immunohistochemische Auswertung.....	50
3.8.1	p-STAT3	50
3.8.2	Interleukin-6.....	51
3.8.3	Sonic Hedgehog	51
3.8.4	Nestin.....	51
3.8.5	NF- κ B.....	53
3.8.6	Amylase.....	55
3.8.7	Pdx-1	55
4.	Diskussion	58
5.	Zusammenfassung.....	63
5.1	Deutsche Zusammenfassung	63
5.2	Englische Zusammenfassung.....	64
6.	Literatur.....	67
7.	Anhang.....	78
7.1	Abkürzungen und Sonderzeichen	78
7.2	Abbildungen	82
7.3	Tabellen	84
7.4	Publikationen und Vorträge	85
7.5	Verzeichnis akademischer Lehrerinnen und Lehrer	86
7.6	Dank	87

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom – Überblick

Jedes Jahr erkranken in Deutschland etwa 13.000 Menschen an Bauchspeicheldrüsensarkrebs, von denen innerhalb von fünf Jahren nahezu alle an ihrem Tumorleiden versterben. Die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt lediglich rund fünf Prozent (Ma et al., 2013; RKI, 2010).

Das duktale Adenokarzinom ist mit ca. 85 Prozent der mit Abstand häufigste maligne Tumor des Pankreas. Es macht drei Prozent aller bösartigen Neoplasien in Deutschland aus, ist aber für mehr als sechs Prozent der Krebstodesfälle verantwortlich (RKI, 2010; Rückert et al., 2010).

Die Gründe für diese ungünstige Prognose liegen in einer ausgesprochen aggressiven Tumorzellbiologie und der meist späten Diagnosestellung, da das Pankreaskarzinom anfangs – wenn überhaupt – nur mit uncharakteristischen Beschwerden assoziiert ist, die leicht mit benignen Erkrankungen verwechselt werden können. Die Diagnose erfolgt oft erst in späten Stadien, wenn der Tumor bereits so weit gewachsen ist, dass er symptomatisch wird, indem er beispielsweise den Abfluss von Verdauungsenzymen oder Galle ins Duodenum verhindert und sich die Betroffenen mit intestinalen Störungen wie z. B. Fettstühlen oder Ikterus vorstellen. Etwa 80 Prozent der Patienten klagen über diffuse Oberbauchschmerzen und Gewichtsverlust. Eine Ausstrahlung der Schmerzen in den Rücken deutet auf ein fortgeschrittenes lokales Wachstum mit Nerveninfiltration oder eine bereits stattgefundene Metastasierung hin. Etwa 70 Prozent der Karzinome befinden sich im Bereich des Pankreaskopfes, 20 Prozent im Korpus und ein Zehntel ist in der Cauda pancreatis lokalisiert (Fernandez-del Castillo et al., 2011).

Bisher besteht der einzige potentiell kurative Therapieansatz in der chirurgischen Resektion. Bei Diagnosestellung weisen allerdings lediglich 10 bis 20 Prozent der Patienten einen chirurgisch resektablen Tumor auf. Bei negativem Lymphknotenbefund beträgt das Fünf-Jahres-Überleben 36 Prozent respektive 10 Prozent bei befallenen Lymphknoten (Friess et al., 2003; Ryan et al., 2011; Trede et al., 1990).

Auch nach erfolgreicher Operation mit R0-Resektion beträgt das mediane Überleben nur etwa ein Jahr, kann allerdings durch eine adjuvante Chemotherapie mit dem Cytidin-Analogen Gemcitabin auf bis zu 20 Monate verlängert werden (Ne-

optolemos et al., 2004; Oettle et al., 2007). Gemcitabin ist nach einer Studie, die seine Überlegenheit im Vergleich zu Fluoruracil zeigte, zum chemotherapeutischen Standard beim Pankreaskarzinom geworden – sowohl im adjuvanten Rahmen als auch bei metastasiertem Leiden (Burris et al., 1997).

Bei den rund 80 Prozent der Patienten, die sich mit einem metastasierten oder nicht mehr resektablen Tumor vorstellen, weil dieser z. B. lokale Gefäße infiltriert, beträgt die Überlebenszeit drei bis vier Monate. Hier bestehen keinerlei kurative Aussichten. Eine bestmögliche palliative Versorgung und „best supportive care“ sind angezeigt, um noch lange eine gute Lebensqualität zu erhalten (Fernandez-del Castillo et al., 2011). Auch im palliativen Rahmen wird Gemcitabin eingesetzt. Sein Einsatz bei Patienten mit nicht-resektablen Pankreaskarzinomen reduziert Tumorschmerzen, verbessert den Karnofsky-Performance-Status und mindert den Gewichtsverlust ebenso, wie er die Lebensqualität steigert (Andersson et al., 2009; Burris et al., 1997).

In zahlreichen Phase-3-Studien wurden verschiedene zytotoxische Wirkstoffe und sogenannte „targeted therapies“, beispielsweise mit monoklonalen Antikörpern, in Kombination mit Gemcitabin getestet, ohne dass dabei eine wesentliche klinische Verbesserung gegenüber der Anwendung von Gemcitabin allein gezeigt werden konnte (Colucci et al., 2002; Cunningham et al., 2009; Di Marco et al., 2010; Louvet et al., 2005; Oettle et al., 2005; Rocha Lima et al., 2004). Ebenso wenig konnten Bestrahlungstherapien das Überleben mit einem Pankreaskarzinom relevant verlängern (Ryan et al., 2011).

Lediglich die Addition des Tyrosinkinaseinhibitors Erlotinib brachte einen geringen, aber signifikanten Überlebensvorteil (Moore et al., 2007). Conroy und Kollegen konnten 2011 demonstrieren, dass FOLFIRINOX, ein Chemotherapie-Regime bestehend aus Folinsäure (Leucovorin), Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin, im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie einen signifikanten Überlebensvorteil bringt, dies jedoch um den Preis einer höheren Toxizität (Conroy et al., 2011; Michl und Gress, 2013).

Aufgrund mikro- und makroskopischer Beobachtungen, die deutlich machen, wie aus Kolonpolypen Adenome und aus diesen Karzinome hervorgehen, wurde ein Dysplasie-Karzinom-Modell für das kolorektale Karzinom etabliert, welches zeigt, wie aus Vorläuferläsionen Krebs entstehen kann (Vogelstein et al., 1988). Ähnlich dieser *Adenom-Karzinom-Sequenz* bei kolorektalen Karzinomen, wird beim dukta-

len Adenokarzinom des Pankreas ein epithel-morphologischer Transformationsprozess postuliert. In der Bauchspeicheldrüse entwickeln sich hierbei sogenannte „Pancreatic Intraepithelial Neoplasias“ (PanINs) aus normalem intraduktalem Epithel, die in ein invasives Pankreaskarzinom übergehen können. Vom gesunden Gangepithel ausgehend, entwickeln sich diese von flachen Epithelhyperplasien (PanIN-1A) über papilläre Hyperplasien ohne (PanIN-2A) und mit Atypien (PanIN-2B) hin zu einem Carcinoma in situ (PanIN-3) oder weiter zu einem invasiven Pankreaskarzinom (PanIN-4) (Hruban et al., 2001; Wilentz et al., 2000).

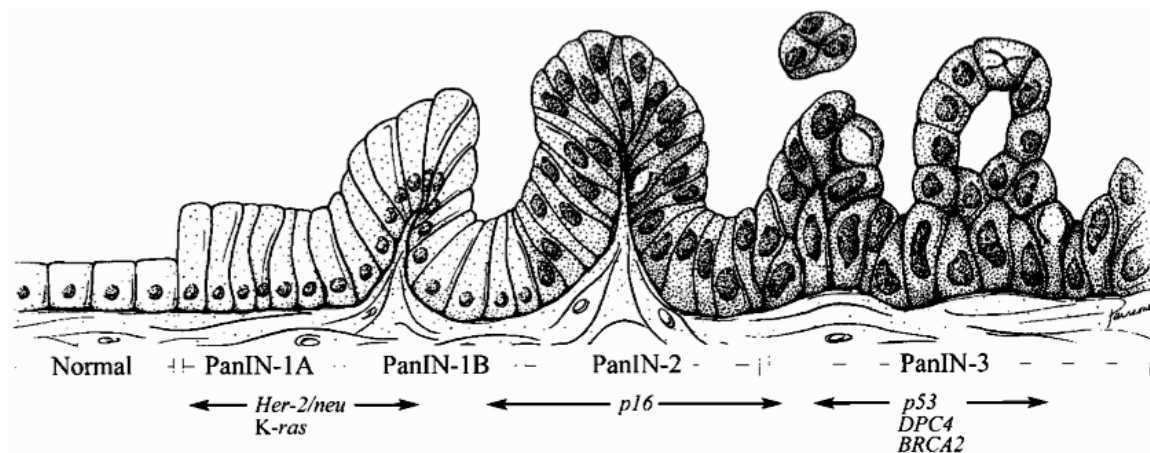


Abb. 1: Entwicklung von duktalem Pankreasepithel zu PanIN-Läsionen (Wilentz et al., 2000)

1.2 Risikofaktoren für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms

Der wichtigste vermeidbare Auslöser von Bauchspeicheldrüsenkrebs ist das Rauchen – verantwortlich für rund 30 Prozent der Fälle, ansteigend mit der Zahl der „pack years“ (Bueno de Mesquita et al., 1991). In vielen Studien ist Übergewicht und physische Inaktivität mit einem höheren Risiko assoziiert (Larsson et al., 2007; O'Rorke et al., 2010). Auch die sogenannte westliche Ernährung mit hohem Konsum von Fett und gebratenem Fleisch wird mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Bauchspeicheldrüsenkrebs in Verbindung gebracht (Nothlings et al., 2005).

Eine chronische Pankreatitis erhöht, ob erworben oder hereditär, unabhängig von ihrer Genese das relative Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken um das 14- bis 18-Fache. Dies wird durch den Kofaktor Tabakkonsum exponentiell gesteigert (McKay et al., 2008).

Die Datenlage für den Zusammenhang mit Alkoholkonsum ist uneinheitlich und wird durch den Confounder Rauchen beeinflusst (Fernandez-del Castillo et al., 2011).

Fünf bis zehn Prozent der an einem Pankreaskarzinom Erkrankten haben einen betroffenen erstgradigen Verwandten. Das relative Risiko für eine Person mit entsprechend positiver Familienanamnese wird in der Literatur zwischen 1,5 und 13 angegeben (Bartsch et al., 2004; Tersmette et al., 2001). Beispielsweise das BRCA1- und das auch in unserem Labor erforschte BRCA2-Gen, das Peutz-Jeghers-Syndrom, Ataxia telangiectasia oder Defekte von CDKN2A werden neben K-ras- und p53-Mutationen auf genetischer Ebene dafür verantwortlich gemacht (Feldmann et al., 2011; Klein et al., 2001).

1.3 Molekulare Ursachen des Pankreaskarzinoms

Krebs entsteht durch dynamische Veränderungen im Genom, ist also eine Erkrankung auf Ebene der Gene. Dabei bilden Onkogene mit einem dominanten „gain of function“ und Tumorsuppressorgene durch ein rezessives „loss of function“ das entscheidende Zusammenspiel (Hanahan und Weinberg, 2000). Dies gilt auch für das Pankreaskarzinom. Einhergehend mit der Klassifizierung der PanINs konnten Hruban und Kollegen zeigen, dass jeder Grad von PanINs auch mit spezifischen genetischen Veränderungen assoziiert ist (Hruban et al., 2006).

1.3.1 Das K-ras-Proto-Onkogen

Die zur Ras-Familie gehörenden kleinen G-Proteine wie Rac, Rho, Cdc42 oder eben K-ras (von „Kirsten rat sarcoma“) sind an vielen Signalkaskaden beteiligt, die physiologischerweise zu Zellproliferationen führen. G-Proteine liegen in zwei Zuständen vor. Sie sind inaktiv, wenn GDP gebunden ist, und können durch den Austausch mit GTP in die aktive Form überführt werden. Dies geschieht unter Einwirkung des Guanine-nucleotide exchange factor (GEF). Durch eine intrinsische GTPase-Aktivität wird das G-Protein wieder in die inaktive Form zurückversetzt, beschleunigt durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP). Eine wichtige Rolle für Zellzyklusprogression, Genexpression, Zellüberleben und -differenzierung spielen besonders folgende Effektorsignalwege: Ras-Raf-MEK-ERK, Ras-PIK3-Akt, Ras-Ral sowie der Ras-Phospholipase-Signalweg (Normanno et al., 2009).

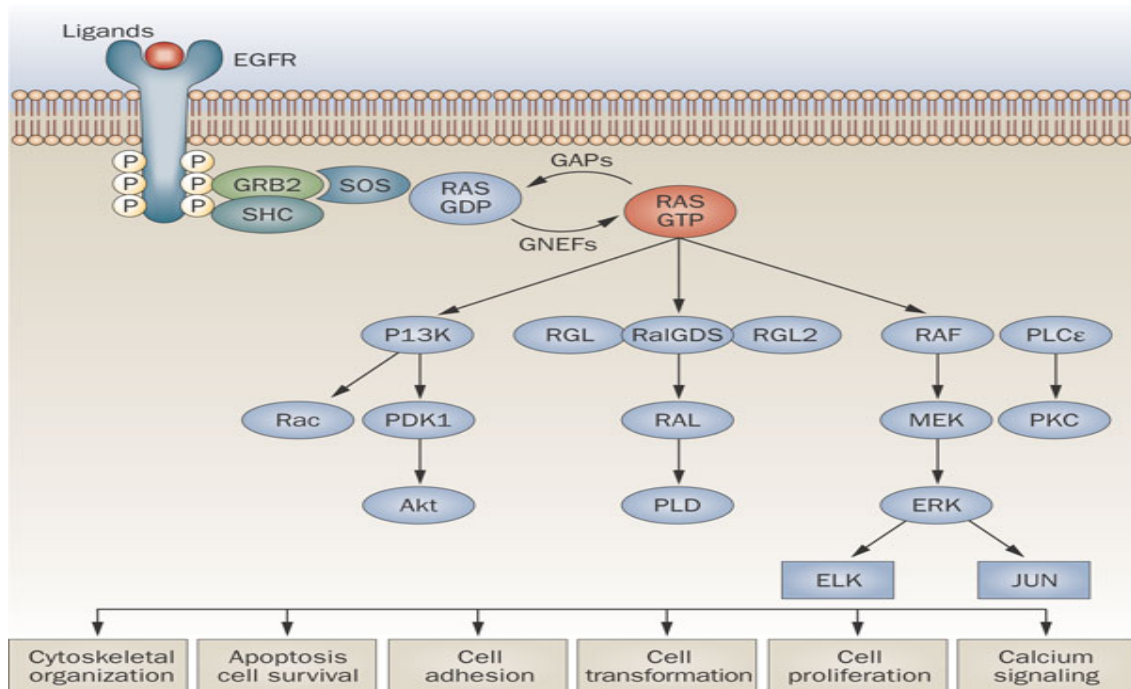


Abb. 2: Ras-Signalwege (Normanno et al., 2009)

Punktmutationen im Gen des Ras-Proteins können zu einem Verlust der GTPase-Aktivität führen, so dass Ras in der GTP-Form verbleibt und die Signalkaskade nicht mehr zum Stillstand kommt. Diese „Gain-of-function-Mutation“ spielt bei vielen malignen Tumoren eine große Rolle, so auch beim Pankreaskarzinom, wo aktivierende K-ras-Punktmutationen im Kodon 12 zu den frühesten genetischen Veränderungen gehören. So sind diese in bis zu 30 Prozent der anfänglichen PanIN-Läsionen anzutreffen und zu über 90 Prozent im duktaalen Adenokarzinom präsent (siehe Abb. 1) (Schneider et al., 2003). Aufgrund ihres frühen Auftretens bereits in präkanzerösen Veränderungen wie der chronischen Pankreatitis bestimmen Mutationen von K-ras beim Pankreaskarzinom ganz besonders die Initiierung der Karzinogenese (Pellegata et al., 1994).

1.3.2 Das Tumorsuppressor-Gen p53

Das auf dem kleinen Arm von Chromosom 17 gelegene Tumorsuppressor-Gen p53 ist das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Malignomen. Es ist ein nukleäres Protein mit einer Masse von 53kDa, welche zu seiner Namensgebung führte. Als „Wächter des Genoms“ reguliert p53 Apoptose und Zellproliferation über diverse an der Zellzykluskontrolle beteiligte Cycline und Cyclin-abhängige

Kinasen (CDKs) oder pRb, das Retinoblastom-Protein (siehe Abb. 3). Als Transkriptionsfaktor steuert p53 die Synthese des CDK-Inhibitors p21 und proapoptischer Proteine. Bei DNA-Schäden sorgt p53 für einen Zellzyklusarrest bis der Schaden behoben ist oder schickt bei einem irreparablen Defekt die Zelle in die Apoptose. Ist p53 mutiert, kann dies dazu führen, dass Zellen weiterhin proliferieren, obwohl ihre DNA bereits geschädigt ist (Weinberg, 2007).

In über 60 Prozent der Pankreaskarzinome ist eine Inaktivierung von p53 anzutreffen. Die dabei auftretenden Missense-Mutationen führen häufig zum Verlust eines der beiden Allele und damit zu einem „loss of heterozygosity“. Dies ist mitverantwortlich für die bei Pankreaskarzinomen typische genomische Instabilität (Schneider et al., 2003).

p53-Defekte induzieren eine raschere Progression der Karzinomentwicklung, einhergehend mit lokalem Lymphknotenbefall und verringerten Überlebenszeiten. Gleichwohl ist damit keine gesteigerte Tumorgroße oder verstärkte Fernmetastasierung assoziiert. p53-Mutationen spielen beim Pankreaskarzinom hauptsächlich eine Rolle in fortgeschrittenen Stadien der Karzinogenese und sind frühestens bei PanIN2- oder PanIN3-Läsionen des Tumorprogressionsmodells (siehe Abb. 1) zu finden (Schneider et al., 2003).

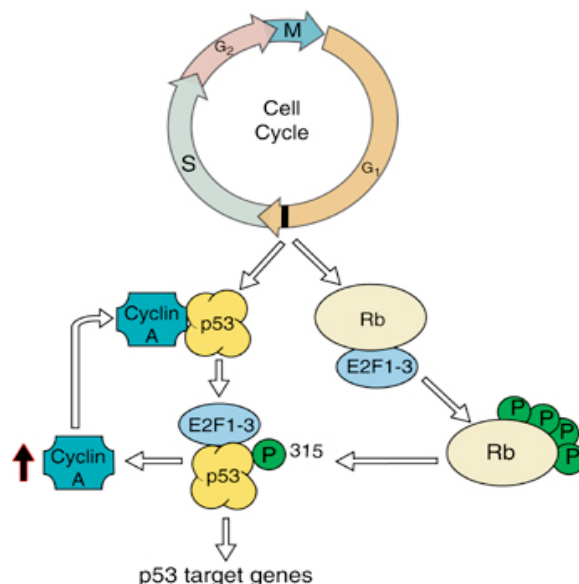


Abb. 3: p53-Signalwege im Zellzyklus (Braithwaite et al., 2006)

1.4 Personalisierte Medizin

Ziel der personalisierten Medizin ist es insbesondere, anhand von individuellen Biomarkern zu eruieren, welche Patienten von einer bestimmten Therapie profitieren und welche nicht (Hoffmann und Poremba, 2010). Dabei strebt man danach, getreu der hippokratischen Tradition „Primum nihil nocere“, mit dem geringstmöglichen Schaden den größtmöglichen Nutzen zu erzielen. So soll beispielsweise onkologischen Patienten, die von einer spezifischen Therapie keinen Vorteil genießen, die entsprechende Behandlung mitsamt ihren Nebenwirkungen erspart bleiben, um ihnen zu bestmöglicher Lebensqualität in der verbleibenden Lebenszeit zu verhelfen.

Als Meilenstein der personalisierten Medizin gilt, als 1998 die Food and Drug Administration (FDA) die Zulassung des Brustkrebsmedikaments Trastuzumab (Herceptin®) vom Nachweis der Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors HER2/neu abhängig machte (Hoffmann und Poremba, 2010). Hierbei handelt es sich also um einen auf die Wirksamkeit eines Arzneimittels bezogenen molekularen Marker.

Auch aus ökonomischer Sicht ist die personalisierte Medizin in Zeiten exorbitant teurer „targeted therapies“ besonders in der Onkologie von Bedeutung, wie z. B. beim Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib, der seine Wirksamkeit beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom nur bei einer L858R-Mutation im Wachstumsrezeptor EGFR entfalten kann, sonst aber keinen Überlebensvorteil bringt (Hoffmann und Poremba, 2010).

Dies ist der wissenschaftliche Hintergrund, vor dem die Idee für diese Arbeit entstanden ist.

1.5 Inflammation, SIRS und Tumorgenese

Krebs, der mit einer chronischen Entzündung einhergeht, ist häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert (McKay et al., 2008). Eine generelle Entzündungsreaktion des gesamten Organismus, das sogenannte systemische inflammatorische Response-Syndrom (SIRS), im erweiterten Sinne biochemisch diagnostizierbar anhand diverser Botenstoffe wie z. B. Interleukin-6, Interleukin-1 α oder C-reaktivem Protein, wurde als stadienunabhängiger prognostischer Marker für diverse Krebserkrankungen beschrieben (Ikeda et al., 2003; McMillan et al., 2003).

Während bei manchen Krebsformen entzündliche Prozesse bereits anzutreffen sind, bevor eine maligne Transformation auftritt, induziert bei anderen Entitäten der bösartige Progress selbst ein entzündliches „Microenvironment“, welches die Tumorentwicklung beim Voranschreiten intrinsisch unterstützt. Unabhängig ihres Ursprungs befördern dabei peritumorale Entzündungen die Proliferation und Immortalisierung maligner Zellen, treiben Angiogenese und Metastasierung voran, untergraben die Immunantwort oder reduzieren die Wirkung von Chemotherapeutika (Mantovani et al., 2008).

Es sind einige Auslöser für primär durch Entzündungen hervorgerufene Krebsleiden bekannt. Beispielsweise können durch das Bakterium *Helicobacter pylori* induzierte Gastritiden Magenkarzinome und MALT-Lymphome hervorgerufen werden und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen vermögen kolorektale Karzinome auszulösen. Diese Form der Interaktion von Inflammation und Krebs wird auch als extrinsisch bezeichnet (Mantovani et al., 2008).

Als Beispiel entzündungsmodulierender Effekte sei an dieser Stelle exemplarisch für das Pankreaskarzinom erneut der Ras-Raf-Signalweg aufgeführt (siehe Kapitel 1.3.1 und Abb. 2), der die Produktion von tumorfördernden inflammatorischen Cytokinen und Chemokinen induziert. So können dominante Onkogene die Entwicklung eines tumorbegünstigenden entzündlichen Microenvironment vorantreiben (Sparmann und Bar-Sagi, 2004).

Zusätzlich zu ihrer ätiologischen Rolle bei der Krebs-Initiierung spielt Inflammation also eine entscheidende Rolle bei Wachstum, Gewebsinvasion und Metastasierung von Krebszellen (McKay et al., 2008).

Bei Pankreaskarzinomen sind Entzündungen in beiden Rollen anzutreffen. So werden PanINs und invasive duktale Adenokarzinome sowohl auf extrinsischem Wege durch milde chronische Pankreatitiden, als auch intrinsisch durch Mutationen im K-ras-kodierenden Gen induziert. Die extrinsische Entzündungssituation in Form der chronischen Pankreatitis ist anschließend entscheidend für das Fortschreiten der Karzinogenese verantwortlich (Guerra et al., 2007).

Das Auftreten mancher Entitäten wird reduziert oder verzögert durch eine Behandlung mit ACE-Hemmern oder nichtsteroidalen Antiphlogistika wie Acetylsalicylsäure. Dies konnte beispielsweise in vorangegangenen Arbeiten unseres Labors im transgenen Tumormausmodell für das Pankreaskarzinom gezeigt werden (Fendrich et al., 2010; Flossmann et al., 2007).

Als Schlüsselfaktoren des intrinsischen Zusammenspiels konnten z. B. NF κ B und diverse Cytokine wie Interleukin-1 α und Interleukin-6 identifiziert werden (Grivennikov und Karin, 2008; Karin, 2006; Voronov et al., 2003).

Ein weiterer Vorteil antientzündlicher Therapien ist die reduzierte Tumorkachexie, da proinflammatorische Cytokine nicht nur das Tumorstadium fördern, sondern auch mitverantwortlich sind für paraneoplastische katabole Reaktionen (McKay et al., 2008).

1.6 Systemische Entzündung und prognostische Marker

In vielen Fällen bleibt die genaue individuelle Prognose für Patienten mit einem Pankreaskarzinom unklar. Daher ist es wünschenswert, anhand zu etablierender Biomarker die Prognose einer jeden Patientin und eines jeden Patienten besser zu evaluieren, um ihr oder ihm eine optimale personalisierte Therapie zukommen zu lassen (McKay et al., 2008).

Unabhängig von der inflammatorischen Genese, ob also extrinsisch oder intrinsisch, will die Frage beantwortet sein, wie der Grad der Entzündung am besten gemessen wird. Im Fokus der heutigen Forschung sind dafür insbesondere die im folgenden besprochenen Parameter.

1.6.1 Das C-reaktive Protein

Das homopentamere in der Leber synthetisierte C-reaktive Protein (CRP) gehört zu den Akute-Phase-Proteinen. Es wird induziert durch proinflammatorische Cytokine, wie z. B. Interleukin-6 oder Tumornekrosefaktor- α (Castell et al., 1990). Neben seinem Status als Routine-Laborparameter für Entzündungen, ist CRP für das kolorektale Karzinom als von TNM-Klassifikation und Performance-Status unabhängiger prognostischer Biomarker erforscht (Miki et al., 2004).

Dies konnte in folgenden klinischen Studien auch für das Pankreaskarzinom aufgezeigt werden:

Tabelle 1: CRP als unabhängiger prognostischer Faktor beim Pankreaskarzinom; nach McKay (2008)

Autor	Tumorstadium	Patienten	Bemerkung
Falconer et al. (1995)	fortgeschritten/inoperabel	102	CRP und Albumin prognostisch unabhängig vom Tumorstadium
Ueno et al. (2000)	fortgeschritten/inoperabel	103	CRP prognostisch unabhängig von Tumorstadium und Behandlung
Engelken et al. (2003)	fortgeschritten/inoperabel	51	CRP unabhängig vom Tumorstadium
Glen et al. (2006)	fortgeschritten/inoperabel	187	Kombination aus CRP und Albumin (Glasgow Prognostic Score, GPS) prognostisch unabhängig vom Tumorstadium
Fearon et al. (2006)	fortgeschritten/inoperabel	170	CRP prognostisch unabhängig von Gewichtsverlust und reduzierter Nahrungsaufnahme
Nakachi et al. (2007)	fortgeschritten/inoperabel	74	CRP prognostisch unabhängig von Performance Status und peritonealer Dissemination unter Gemcitabin-Therapie
Tingstedt et al. (2007)	fortgeschritten/inoperabel	119	CRP prognostisch unabhängig von Tumorgröße und Behandlung
Jamieson et al. (2005)	operabel	65	Prä- und postoperatives CRP prognostisch unabhängig vom Tumorstadium

1.6.2 Interleukin-1 α

Interleukin-1 α ist ein pleiotropes Cytokin, das inflammatorische und immunologische Prozesse begleitet. Deutlich erhöhte Werte sind bei akuten (z. B. Sepsis) oder chronischen (z. B. rheumatoide Arthritis) entzündlichen Erkrankungen zu erwarten. Es induziert Fieber sowie die Synthese von Akute-Phase-Proteinen und steigert die Freisetzung proinflammatorischer Enzyme wie Cyclooxygenase-2. Interleukin-1 α ist auch entscheidend in maligne Prozesse involviert. Einerseits fördert es Karzinogenese und maligne Transformation, Invasion und Metastasierung, andererseits aktiviert Interleukin-1 α Immunreaktionen, die das Tumorstadium hemmen. In der neoplastischen Umgebung wird Interleukin-1 α als Reaktion auf vom Tumor sezernierte Faktoren von Stromazellen und infiltrierenden Leukozyten

im Rahmen der das Krebsgeschehen begleitenden Immunreaktion produziert. Interleukin-1 α vermittelt also Interaktionen von malignen Zellen mit dem Immunsystem des Trägers (Apte und Voronov, 2008).

Erhöhte Interleukin-1 α -Werte sind beim humanen Pankreaskarzinom mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (Tjomsland et al., 2011).

1.6.3 Interleukin-6

Das proinflammatorische Cytokin Interleukin-6 tritt im Zusammenspiel mit diversen Krankheiten auf und ist u. a. dem Tumornekrosefaktor- α untergeordnet. In der Leber stimuliert es die Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie CRP (Glen et al., 2006). Es wird auch bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom überexprimiert (Okitsu et al., 2010). Interleukin-6 wird vom Tumorstroma und von infiltrierenden inflammatorischen Zellen produziert. Es ist als Wachstumsfaktor für Pankreaskarzinome anerkannt (Friess et al., 1999). Seine Rolle dabei ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. Gleichwohl sind beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas erhöhte Serumwerte von Interleukin-6 unmittelbar mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. So betrug für Patienten mit Werten von über 5,2pg/ml die Einjahres-Überlebensrate null Prozent bei einem medianen Überleben von knapp fünf Monaten gegenüber einer 49-prozentigen Einjahres-Überlebensrate bzw. etwa 11 Monaten medianem Überleben bei Werten unter 5,2pg/ml (Ebrahimi et al., 2004).

Gegenüber dem C-reaktiven Protein wird Serum-Interleukin-6-Werten eine höhere diagnostische und prognostische Präzision zugeschrieben (Mroczko et al., 2010).

1.6.4 STAT3

Der signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) ist ein Protein, das beim Menschen vom entsprechenden STAT3-Gen kodiert wird. STAT3 wird an einem Tyrosin-Rest durch die zytoplasmatische Tyrosinkinase JAK2 (Janus-Kinase 2) phosphoryliert und damit aktiviert. Über diesen sogenannten JAK-STAT-Pathway vermitteln u. a. diverse Interferone, Zytokine und eben auch Interleukine ihre Wirkung, indem schließlich Dimere gebildet werden, die zum Zellkern migrieren, um dort als Transkriptionsfaktoren zu fungieren. Interleukin-6 ist beispielsweise als Ligand dieser Signalkaskade einer der stärksten Aktivatoren von STAT3

(Yu et al., 2009). STAT3-Überaktivierung konnte als onkogener Schlüsselfaktor bei diversen epithelialen Krebserkrankungen identifiziert werden und ist darüber hinaus mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Im Mausmodell zeigte sich eine STAT3-Erhöhung als entscheidend bei der Tumorgenese von malignen Haut- und Magenkarzinomen (Chan et al., 2004; Jenkins et al., 2005) und auch des Pankreaskarzinoms (Fukuda et al., 2011).

Im Pankreas ist STAT3 bei der normalen Entwicklung entbehrlich (Lee und Hennighausen, 2005), wohingegen die Mehrheit duktaler Adenokarzinome des Pankreas eine relevante Aktivierung von STAT3 aufweisen (Corcoran et al., 2011).

Ebenso wichtig ist die Eigenschaft von STAT3, bereits die Konversion von ruhenden adulten Pankreaszellen zu Vorläuferzellen von malignen Prozessen zu induzieren – ein Prozess, der acinär-duktales Metaplasie (ADM) genannt wird (Fukuda et al., 2011).

1.6.5 NFκB

Der nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NFκB) ist ein Koordinator von angeborener Immunantwort und Entzündung, bekannt auch als wichtiger endogener Tumorpromotor, der Inflammation und Krebs verbindet, indem er Zellzykluskontroll-Gene wie Cyclin D1 und C-Myc oder Angiogenese-Gene wie VEGF steuert. Auch ist er verantwortlich für Gewebsinvasion, das Ausschütten von Wachstumsfaktoren und antiapoptotische Effekte, insbesondere durch die Expression des BCL2-Gens. NFκB reguliert zudem die Ausschüttung von Cytokinen durch Tumorzellen herauf, wodurch wiederum in einem Circulus vitiosus eine erneute NFκB-Expression induziert wird (McKay et al., 2008).

Darüber hinaus besteht ein evidenter Zusammenhang zwischen NF-κB und HIF1α-Systemen und damit eine Verbindung von angeborenem Immunsystem und den hypoxischen Reaktionen maligner Prozesse (Mantovani et al., 2008).

Für das Pankreaskarzinom konnte aufgezeigt werden, dass die Hemmung der Aktivität von NFκB das Potential hat, den Effekt einer Gemcitabin-Chemotherapie zu verbessern (Arlt et al., 2003).

1.7 Entzündung und Chemotherapieversagen

Patienten mit einem Pankreaskarzinom weisen entweder von Anfang an eine Chemoresistenz gegenüber Gemcitabin auf oder entwickeln diese im Verlauf der Behandlung (Andersson et al., 2009).

Nakachi und Kollegen konnten für humane Pankreaskarzinome zeigen, dass ein erhöhtes C-reaktives Protein, eine chronische systemische inflammatorische Immun-Antwort widerspiegelnd, unabhängig vom TNM-Stadium mit einem schlechteren Ansprechen der Gemcitabin-Chemotherapie assoziiert ist (Nakachi et al., 2007). Eine Erklärung dafür ist, dass im entzündlichen Tumor-Microenvironment das „drug delivery“ zur Zielstruktur nicht mehr optimal erfolgen kann. Denn um seine zytotoxische Wirkung zu entfalten, muss Gemcitabin in seine Zielzellen über nukleosidische Transporter gelangen. Den wichtigsten Part übernimmt dabei hENT1, der human equilibrative nucleoside transporter 1 (Spratlin et al., 2004). Je mehr dieser Proteine exprimiert werden, umso besser ist das chemotherapeutische Ansprechen. Es gibt Ansätze, hENT1 als prognostischen Biomarker für das Pankreaskarzinom zu etablieren. Farrell und Kollegen konnten in einer prospektiv-randomisierten Studie zeigen, dass bei Pankreaskarzinompatienten unter Gemcitabin-Therapie eine vermehrte Expression von hENT1 mit einem verbesserten Gesamtüberleben assoziiert ist (Farrell et al., 2009). Die hENT1-Expression korreliert also mit dem therapeutischen Benefit von Gemcitabin (Rauchwerger et al., 2000).

Weitere Forschungsergebnisse deuten auch darauf hin, dass in bestimmten Situationen Entzündungsreaktionen dabei helfen, Krebszellen zu bekämpfen. So ist beispielsweise die Präsenz eosinophiler Granulozyten in kolorektalen Karzinomen oder das Vorhandensein Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) in Mamma- und Pankreasmalignomen mit einer günstigeren Prognose verknüpft (Mantovani et al., 1992).

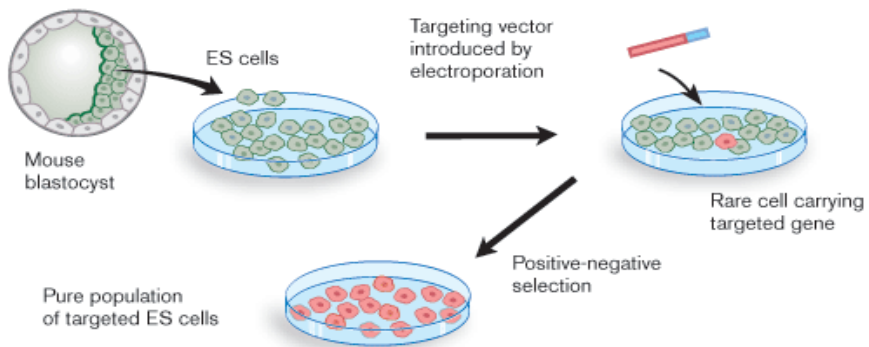
Die Zusammenhänge von Krebs und Entzündung bleiben also gerade aufgrund des Dualismus von die Karzinogenese fördernden und hemmenden Eigenschaften komplex.

1.8 Transgene Tumormausmodelle

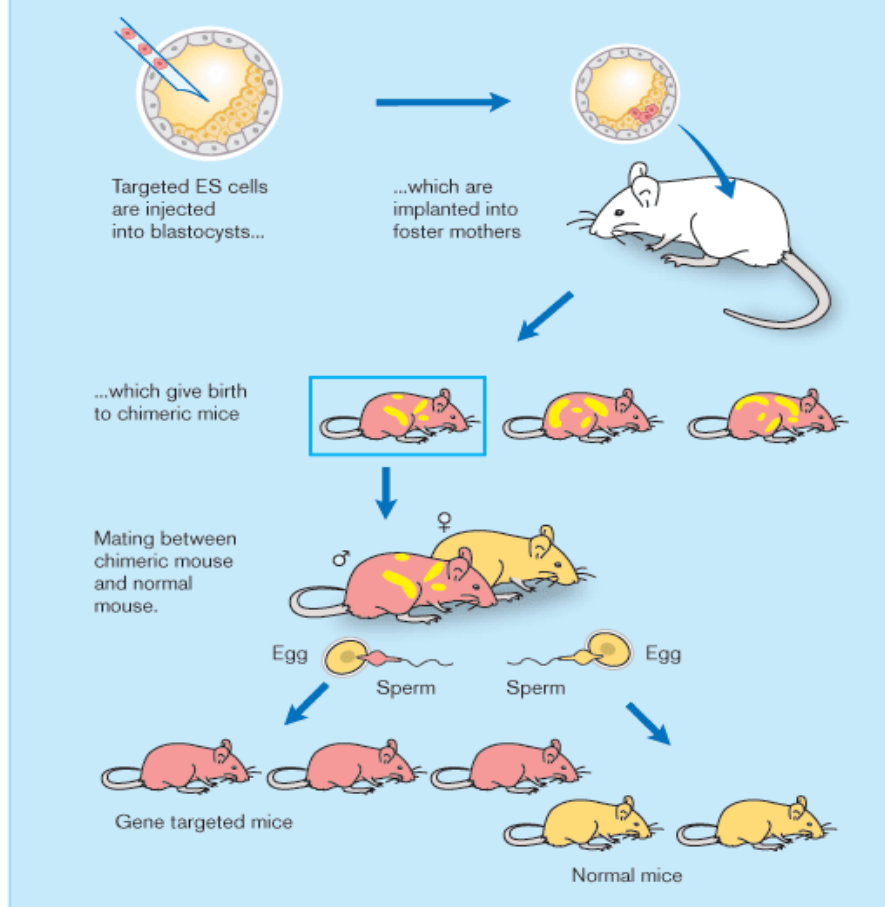
Genetisch veränderte Modellorganismen sind mittlerweile aus der medizinischen Forschung nicht mehr wegzudenken. Insbesondere Wirbeltiere wie *Mus musculus* stehen dabei im Fokus der Wissenschaft. Gegenüber orthotopen Tumormodellen zeichnen sich diese sogenannten „genetically engineered mouse models“ (GEMM) durch eine wesentlich realistischere Widerspiegelung der Tumorentwicklung aus. Durch die Knockout-Technologie wurde es möglich, Gene in der Keimbahn z. B. von Mäusen, gezielt so zu verändern, dass ihr Nachwuchs die nach Wunsch veränderten Zielgene in sich trägt und exprimiert. Dafür werden bei einer Maus embryonale Stammzellen aus einer Blastozyste entnommen. In diese wird mithilfe eines nach voriger Elektroporation implantierten Vektors *in vitro* das Zielgen eingeführt, bevor die das Wunschmerkmal tragenden Zellen purifiziert und durch homologe Rekombination kloniert werden. Die gewonnenen genmanipulierten Zellen werden nun in die Blastozyste einer Leihmutter-Maus injiziert. Nach Mendel'schen Regeln kann man dann durch Zucht in der übernächsten Generation (F2) die gewünschten merkmals tragenden Tiere gewinnen.

Im Jahre 2007 erhielten Mario R. Capecchi, Martin J. Evans und Oliver Smithies den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für ihre bahnbrechende Entdeckung der Prinzipien und Techniken des Einführens von spezifischen Genmodifikationen in Mäuse mit Hilfe von embryonalen Stammzellen (Hansson, 2007).

A. Gene targeting of embryonic stem cells



B. Generation of gene targeted mice



ANNIKA RÖHL

Abb. 4: **A.** Gen-Targeting und Klonieren einer Zelllinie embryonaler Stammzellen mit der gewünschten Mutation. **B.** Die so gewonnenen embryonalen Stammzellen (ES) werden in Blastozysten injiziert, welche Leihmütter-Mäusen eingepflanzt werden, um eine chimäre Generation zu gewinnen, deren Nachkommen dann das mutierte Gen tragen können (Hansson, 2007).

1.9 Das Pankreaskarzinom im transgenen Tumormausmodell

Auch für das duktales Adenokarzinom des Pankreas existieren heute einige transgene Mausmodelle. 2003 entwickelte eine Forschergruppe um David Tuveson erstmals ein Tumormausmodell, bei dem unter Kontrolle des pankreasspezifischen Pdx-1-Promotors eine onkogene Form von K-ras exprimiert wird. Die dafür notwendigen gain-of-function-Mutationen sind an bestimmten Stellen des Ras-Gens anzutreffen, insbesondere Thymin→Adenin-Transversionen in Kodon 12, 13 und 61. Die K-ras-Mutationen sind von Lox-Stop-Lox-Elementen (LSL) flankiert, die vorerst Transkription und Translation verhindern. Wird nun jedoch eine solche LSL-Kras^{G12D}-Maus mit einem Tier gekreuzt, welches, gesteuert vom Pdx-1-Promotor, die Rekombinase Cre in sich trägt, führt bei deren Nachkommen Cre zum Herausschneiden der flankierenden LSL-Elemente und somit zur Expression der onkogenen Form des K-ras-Proteins. Gleichwohl geschieht dieser Vorgang lediglich in der Bauchspeicheldrüse bzw. allen Pdx-1-positiven Zellen, da durch das nahezu exklusive Vorhandensein von Pdx-1 im Pankreas nur hier Cre seine Wirkung entfalten kann (siehe Abb. 5). Alle anderen somatischen Zellen tragen einen normalen Wildtyp des Zielgens (Hingorani et al., 2003). Die Eleganz der Anwendung dieses Modells liegt u. a. auch darin begründet, dass die Mäuse hierbei vollkommen autark ihr Krankheitsbild entwickeln, der Promotor also nicht erst durch Fütterung von beispielsweise Tamoxifen-haltiger Nahrung aktiviert werden muss.

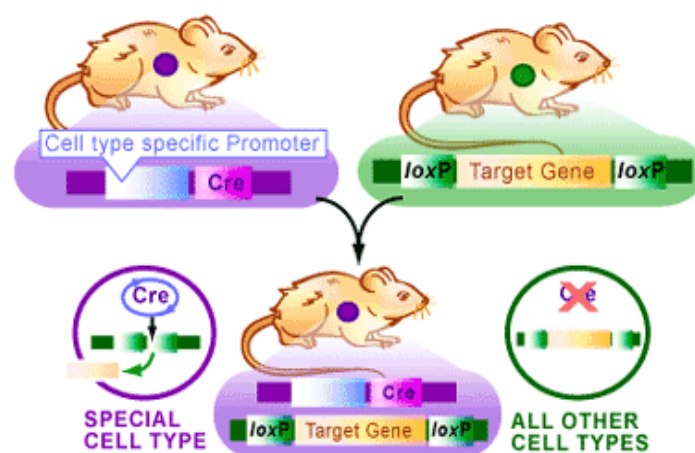


Abb. 5: Cre-Modell. Nur in den speziellen Zellen mit einem an Cre gekoppelten Promotor werden die Zielgene wunschgemäß verändert, alle übrigen entsprechen weiterhin dem Wildtyp (Pechisker, 2004)

Mutationen von K-ras sind bereits in frühen PanINs und zu 90 Prozent im invasiven duktaalen Adenokarzinom anzutreffen (siehe Kapitel 1.3.1 und Abb. 1). Die Tuveson-Gruppe konnte zeigen, dass alle ihre 33 Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D}-Mäuse PanIN-Läsionen entwickelten, die den humanen Vorläuferläsionen entsprechen. Diese Tiere bekamen darüber hinaus mukokutane Papillome und zu sieben Prozent invasive und metastasierende Pankreaskarzinome (Hingorani et al., 2003).

Im Jahre 2005 gelang es dieser Gruppe, zusätzlich eine loss-of-function-Version des p53-Tumorsuppressorgens in das Modell zu implementieren. p53-Mutationen sind in über 60 Prozent der Pankreaskarzinome vorhanden und treten erst später in dessen Genese auf (siehe Kapitel 1.3.2 und Abb. 1).

Bei den so erzeugten Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen traten beeindruckende Ausprägungen auf. So lebte bei einer mittleren Überlebenszeit von fünf Monaten keines der Tiere länger als ein Jahr. 96 Prozent der 28 Mäuse entwickelten invasiven Bauchspeicheldrüsenkrebs, der wie beim humanen Pankreaskarzinom mit malignem Aszites, Tumorkachexie sowie Metastasen in Leber (70 Prozent), Lunge (50 Prozent), Nebennieren und Peritoneum einherging. Auffällige histologische Veränderungen zeigten sich nach vier bis sechs Wochen, manifeste Symptome traten frühestens nach einem Lebensalter von 10 Wochen auf (Hingorani et al., 2005).

Dieses die mehrstufige Tumorprogression des menschlichen Pankreaskarzinoms realistisch widerspiegelnde transgene Tumormausmodell wurde in den Marburger Arbeitsgruppen zum Pankreaskarzinom bereits in vorangegangenen Forschungsprojekten etabliert (Fendrich et al., 2010; Plassmeier et al., 2013).

1.10 Gemcitabin im transgenen Tumormausmodell

Ebenso wie Patienten, die am Pankreaskarzinom erkrankt sind, gewinnen Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse durch eine Gemcitabin-Chemotherapie einen Überlebensvorteil (Neoptolemos et al., 2004; Olive et al., 2009).

1.11 Die Pankreatitis im Tumormausmodell

Persistierende Entzündungen, wie beispielsweise eine chronische Pankreatitis, verringern, wie in Kapitel 1.5 beschrieben, die ohnehin bereits ungünstige Prognose für das Überleben mit einem Pankreaskarzinom zusätzlich (McKay et al., 2008). Auch deshalb ist es von Interesse, eine solche chronische Pankreatitis im Mausmodell verlässlich induzieren zu können. Dies gelingt mit Hilfe des Oligopeptids Caerulein, einem Cholecystokinin-Analogon von 10 Aminosäuren Länge, das eine massiv verstärkte Sekretion von Pankreasenzymen hervorruft, insbesondere von Lipase und pankreatischer Amylase (Kim, 2008). In Abhängigkeit von Zeitplan und Dosis kann entweder eine akute oder eine chronische Pankreatitis induziert werden (Yoo et al., 2005). Letzteres gelang 2007 der Arbeitsgruppe von Carmen Guerra mit einer täglichen intraperitonealen Injektion von 5µg gelöstem Caerulein.

1.12 Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der nach wie vor ernüchternden Prognose für Patienten, die an Bauchspeicheldrüsenkrebs erkranken, war das Ziel dieses Forschungsvorhabens, im transgenen Tumormausmodell den Einfluss von systemischer Inflammation bzw. SIRS und peritumoraler Entzündung auf die Wirksamkeit einer Gemcitabin-Chemotherapie beim invasiven dukталen Pankreaskarzinom zu untersuchen. Die Arbeitsgruppe um Nakachi und Kollegen (2007) konnte in einer retrospektiven Studie an Patienten mit fortgeschrittenen, Gemcitabin-refraktären Pankreaskarzinomen unter „second-line therapy“ zeigen, dass ein erhöhtes CRP unabhängig vom TNM-Stadium mit einem schlechteren Ansprechen der Gemcitabin-Chemotherapie assoziiert ist. Gleichwohl sind die zugrundeliegenden molekularen und physiologischen Mechanismen bisher nur anfänglich erforscht.

Nach dem Motto „from bedside to bench“ wurde sich in der vorliegenden Arbeit zur Aufgabe gemacht, dies unter experimentellen Bedingungen für die „first-line therapy“ Gemcitabin mit weiteren spezifischeren und sensitiveren Entzündungsmarkern zu untersuchen – sowohl *in vivo* am Tiermodell als auch *in vitro* in der Zellkultur.

1.13 Fragestellung

- Wie beeinflussen Caerulein-induzierte chronische Pankreatitis und systemische Inflammation bzw. SIRS die Wirkung des Chemotherapeutikums Gemcitabin im transgenen Tumormausmodell des Pankreaskarzinoms bei Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen?
- Wie wirken sich Gemcitabin-Therapie und Pankreatitis-Induktion auf das Gesamtüberleben der Tiere in den jeweiligen Gruppen aus?
- Lässt sich die Caerulein-induzierte Pankreatitis histologisch, immunohistochemisch und laborchemisch nachweisen?
- Eignen sich CRP, Interleukin-1 α und Interleukin-6 als Biomarker, um verlässlich einen Zusammenhang zwischen systemischer Inflammation und chemotherapeutischem Ansprechen voraussagen zu können?
- Lassen sich die im Tiermodell gewonnenen Ergebnisse in der Zellkultur rekapitulieren?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Mauslinie

Die vorangegangen in Kapitel 1.9 beschriebene, von Hingorani und Kollegen designte Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mauslinie wurde in Marburg durch unsere Arbeitsgruppe etabliert (Fendrich et al., 2010; 2013; Plassmeier et al., 2013). Sie stammt freundlicherweise vom Kooperationspartner Anirban Maitra von der Johns Hopkins University in Baltimore, USA.

2.1.2 Zelllinie

Es wurden humane PaCa44-Zellen in Kooperation mit Dr. rer. nat. Matthias Lauth verwendet. Dabei handelt es sich um eine etablierte permanente Zelllinie, die ursprünglich einem menschlichen Pankreaskarzinom entstammt und dankenswerterweise vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg bereitgestellt wurde.

2.1.3 Medikamente und Behandlungsreagenzien

<i>Wirkstoff</i>	<i>Handelsname</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Hersteller</i>
Caerulein	Caerulein, sulfated	Pulver	MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA
Gemcitabinhydrochlorid	Gemzar 200mg	Pulver	Lilly France S.A.S., Fegersheim, F
Ketaminhydrochlorid	Ketamin Inresa 2ml	50mg/ml	Inresa, Freiburg, D
Interleukin-6, rekombinant human		Pulver	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

2.1.4 Geräte und Zubehör

Nach N.-M. Chen.

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
– 20°C Schrank, Froster	Bosch, Gerlingen, D
– 80°C Schrank, Sepatch	Haraeus, Hanau, D
+ 4°C Schrank, KGS 3213	Liebherr, Biberach, D
Agarosegelträger, Maxi II	Labortechnik, Wasserburg, D
Analysenwaage, Explorer	Ohaus, Gießen, D
Analysenwaage, 572	Kern, Albstadt, D
Autoklav	Biomedis, Gießen, D

Digitalkamera, Olympus FE-330	Olympus, Tokio, J
Eismaschine, 072816	ZIEGRA, Isernhagen, D
Elektrophoresenetzgerät, Power Pac 300	BioRad, München, D
Elektrophoreselaufkammer, Sub-Cell GT	BioRad, München, D
Feuchte Kammer	Eigenkonstruktion
Gewebeeinbett-Entwässerungsautomat Tissue-Tek VIP E150	Sakura, Torrance, USA
Heizblock, Dri-Block DB	Techne, Princeton, USA
Homogenisator/ Shaver, Ultra-Turrax T25 digital	IKA-Werke, Staufen, D
Kühlplatte, Tissue-Tek	Sakura, Torrance, USA
Magnetrührer, MR 2002	Heidolph, Kehlheim, D
Mikroskop (binokular), 020-519.511 (1.6x, 2.5x, 10x, 40x)	Leica, Bensheim, D
Mikroskopkamera, DFC 290	Leica, Bensheim, D
Mikrotom, RM 2155	Leica, Bensheim, D
Mikrowelle, 8017	Privileg, Fürth, D
Markerstift, Super PAP Pen	Zymed, San Francisco, USA
Paraffinspender/ Ausgießstation, Tissue-Tek TEC	Sakura, Torrance, USA
Paraffinstreckbad, WB 24	Medax, Rendsburg, D
Paraffinwärmeplatte, 13501	Medax, Rendsburg, D
pH-Meter, Ultra Basic	Denver Instruments, Göttingen, D
Pipetten, Reference 2,5µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten, Pipetman 20µl, 200µl	Gilson, Villiers-le-Bel, F
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen, D
Quarzküvette, Präzisions-Küvette Suprasil (10mm)	Hellma, Mühlheim/ Baden, D
Thermocycler, Mastercycler EP	Eppendorf, Hamburg, D
Tubes, Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
Tubes, Safe Seal Reagiergefäße 2ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Vortexer, REAX 1 DR	Heidolph, Kehlheim, D
Zentrifuge, Biofuge Pico	Heraeus, München, D

2.1.5 Gebrauchswaren

Produkt	Hersteller
Deckgläser, 24x24mm, 24x46mm	Menzel, Braunschweig, D
Einbettkassetten, Bio-Net Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde, D
Einmalspritzen, 3ml, 10ml	Braun, Melsungen, D
Einmalspritzen/ Insulinspritze, 1ml	Becton Dickinson, Madrid, ESP
Falcon-Röhrchen/ PP-Röhrchen, Cellstar 5ml, 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Filtereinheit (steril), MILLEX GP, 0,22µm	Millipore, Schwalbach, D
Handschuhe, puderfrei, Nobaglove	Kobe, Marburg, D
Mikrotomklingen, S35	Feather, Osaka, J
Objektträger, SuperFrost Plus	Menzel, Braunschweig, D
Einschlussmittel, Roti-Histokitt II	Roth, Karlsruhe, D
Ohrmarken, 1005-1 Manel	National Band & Tag, Newport, USA
Ohrmarkenzange	National Band & Tag, Newport, USA

Petrischalen, Tissue Culture Dishes (94mm x 16mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen, ep T.I.P.S Standard 200ml, 500ml	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen (gestopft), SafeSeal 20ml, 100ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Reaktionsgefäße/ Tubes, Eppendorftubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße/ Tubes, Safe Seal Reagiergefäße 2ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Reaktionsgefäße/ Tubes, PP-PCR-Gefäß 0,2ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Skalpelle, steril, Surgical Disposable Scalpel (Gr. 22)	Aesculap, Tuttlingen, D

2.1.6 Chemikalien

Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur bzw. bei den mit * gekennzeichneten Produkten bei +4°C.

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol *	Merck, Darmstadt, D
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Aqua dest. (steril), Aqua ad iniectabilia	Delta Select, Dreieich, D
Borsäure	Fisher Scientific, Schwerte, D
Bromphenolblau	Sigma, München, D
Citrat	Sigma, München, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
DAB Chromogen *	Dako, Hamburg, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (99+%)	Arcos Organics, Geel, B
Eosin Lösung, alkoholisch (0,5%)	Sigma-Aldrich, München, D
Ethanol, vergällt (≥99%)	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol, absolut (≥99%)	JT Baker, Griesheim, D
Ethidiumbromid (1%) *	Roth, Karlsruhe, D
FBS (Fötales bovines Serum)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Formaldehyd (3,5-3,7% neutral gepuffert)	Fischar, Saarbrücken, D
Foramid	Sigma, München, D
Hämalaun, sauer nach Mayer	Dako, Glostrup, DK
Methanol	Fisher Scientific, Schwerte, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt, D
Paraffineinbettmedium, Hist-COMP (SP 56°C)	Vogel, Gießen, D
Salzsäure (1mol/l)	Merck, Darmstadt, D
TRIzol *	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tween (20%) *	Serva, Heidelberg, D
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt, D
Xylencyanol	Merck, Darmstadt, D
Xylol (≥98%)	JT Baker, Griesheim, D
Wasser (PCR), steril	Sigma, München, D

2.1.7 Enzyme und Nukleotide

Diese Enzyme und Nukleotide wurden bei +4°C gelagert.

Produkt	Hersteller
DNA-Größenstandard, Gene Ruler 50bp	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (10mM)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
Reverse Transkriptase, Super Script III (200U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe, D
RNAse (steril)	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.8 Puffer

Die folgenden Puffer wurden bei +4°C gelagert.

Produkt	Hersteller
BSA (pH 5,2)	Serva, Heidelberg, D
DAB Substrat Puffer	Dako, Hamburg, D
DNA Ladepuffer/ Loading Dye (6x)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
First Strand Buffer (5x), cDNA - Synthese	Invitrogen, Karlsruhe, D
Krebs-Ringer-Puffer	Sigma-Aldrich, München, D
PBS-Dulbecco (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, D

2.1.9 Stammlösungen

Zum Ansetzen und Verdünnen von Stammlösungen wurde doppelt deionisiertes Wasser verwendet. Einstellungen des pH-Werts wurden mit Hilfe von Natriumhydroxid (NaOH) bzw. Salzsäure (HCl) vorgenommen. Die Lagerung erfolgte ebenso bei +4°C.

Art der Lösung	Inhalt
Blocking Solution (10%)	1g BSA ad 10ml PBST
Citratpuffer (pH 6,0)	2,94g Citrat ad 1l H ₂ O
DNA-Ladepuffer	40ml Foramid 40mg Bromphenolblau 40mg Xylencyanol 800μl EDTA (0,5M) pH 8,0 ad 100ml H ₂ O
PBST (1%)	500μl Tween ad 500ml PBS
TBE (10x), Lagerung bei RT	108g Tris (hydroxymethyl) amino-methane 55g Borsäure 8,2g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ad 1l H ₂ O

2.1.10 Antikörper und Konjugate

Antikörper und sekundäre Konjugate wurden bei +4°C gelagert.

2.1.10.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
α – Amylase	Kaninchen	polyklonal	1:500	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
α – Nestin	Ziege	polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg, D
α – NF- κ B	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
α – Pdx-1	Ziege	polyklonal	1:100	Santa Cruz, Heidelberg, D
α – shh	Ziege	polyklonal	1:50	Santa Cruz, Heidelberg, D
α – STAT3	Kaninchen	polyklonal	1:200	Santa Cruz, Heidelberg, D

2.1.10.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
α – Ziege	Peroxidase	1:250	Vector, Burlingame, USA
α – Kaninchen	Peroxidase	1:250	Vector, Burlingame, USA

2.1.10.3 Sekundäre Konjugate

Konjugatkomplex	Kopplung	Verdünnung	Hersteller
Avidin-Biotin	Peroxidase	1:40	Vector, Burlingame, USA
Streptavidin-Biotin	Peroxidase	1:1	Zymed, San Francisco, USA

2.1.11 PCR-Primer

Die verwendeten PCR-Primer wurden von der Firma *eurofins MWG* (Ebersberg, D) bezogen und bei –20°C gelagert.

Genotyp	Primernamen	5'-3'- Primersequenz	Fragmentgröße
K-ras	K-ras WT FW	GTC GAC AAG CTC ATG CGG GTG	500bp
	K-ras 006 WT REV	CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT AGA	
	K-ras Mutant FW	AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC	550bp
	K-ras 006 Mutant REV	CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT AGA	
p53	p53 WT FW	TTA CAC ATC CAG CCT CTG TGG	170bp
	p53 WT REV	CTT GGA GAC ATA GCC ACA CTG	
	p53 Mutant FW	AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC A	270bp
	p53 Mutant REV	CTT GGA GAC ATA GCC ACA CTG	
Cre	Cre FW	CCT GGA AAA TGC TTG TGT CCG	400bp
	Cre REV	CAG GGT GTT ATA AGC AAT CCC	

2.1.12 Gebrauchsfertige Systeme

Die gebrauchsfertigen Systeme wurden entsprechend den Hersteller-Angaben verwendet. Das RNeasy-Kit und das DNeasy-Kit wurden bei Raumtemperatur, die mit * gekennzeichneten Produkte wurden bei +4°C, alle anderen bei –20°C gelagert.

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
BD CBA Multiplexed Bead-Based Immunoassay	BD Biosciences, San Jose, USA
DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
MOUSE C-REACTIVE PROTEIN (CRP) ELISA TEST-KIT	Life Diagnostics, Inc., West Chester, USA
Ready Mix Taq PCR Reaction Mix with MgCl ₂	Sigma, München, D
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
SYBR® GREEN PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Vectastatin ABC Kit Peroxidase Rabbit IgG *	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vectastatin ABC Kit Peroxidase Goat IgG *	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vectastatin ABC Kit Peroxidase Guinea Pig IgG *	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.13 Sterilisation von Materialien

Alle in einem sterilen Zustand zu verwendenden Medien wurden entweder mit einer Porengröße von 0,2µm steril filtriert oder im Autoklaven bei 120°C für 20 Minuten inaktiviert. Glas- und Kunststoffmaterialien wurden ebenfalls autoklaviert. Die Präparationsinstrumente zur Pankreasentnahme wurden mit Hilfe von Ethanol gereinigt und im Autoklaven sterilisiert.

2.1.14 Software

<i>Programm</i>	<i>Hersteller</i>
CorelDRAW Graphics Suite X3 2006	Corel Corporation, Ottawa, CAN
Excel 2000	Microsoft, Redmond, USA
Excel für Mac 2011	Microsoft, Redmond, USA
Paint	Microsoft, Redmond, USA
SPSS Statistics 15.0 for Windows	SPSS, Chicago, USA
Word 2003	Microsoft, Redmond, USA
Word für Mac 2011	Microsoft, Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Maus-Genotypisierung

Nach dem Absetzen des Wurfes aus dem Käfig der Elterntiere wurden die zu diesem Zeitpunkt etwa vier Wochen alten Mäuse mit einem Ohrclip versehen und der äußerste, fünf Millimeter nicht überschreitende Teil der Schwanzspitze mit einer Schere abgetrennt. Daraus wurde die DNA der Maus gewonnen, mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert, gelelektrophoretisch getrennt und mit UV-Licht sichtbar gemacht. Dies wird im folgenden en détail erläutert.

2.2.1.1 DNA-Extraktion aus Mausmaterial

Die Gewinnung der DNA aus den Schwanzspitzen der Mäuse geschah mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Dazu wurde im ersten Schritt die Biopsie mit 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase-K über Nacht bei 56°C im Heizblock inkubiert und lysiert. Der zweite Tag begann mit der Zugabe von 200µl AL-Puffer und anschließendem Vortexen. Jede Probe wurde nach Zugabe von 200µl 100%tigem Ethanol und erneutem Vortexen in die Zentrifugationssäule eines Spin Column aufgetragen, um für eine Minute bei 8000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert zu werden. Dabei blieb die DNA auf der Membran des Spin Column haften, während das Filtrat im 2ml-Sammeltube verworfen wurde. Das Spin Column wurde nun in ein neues 2ml-Sammeltube gestellt und mit 500µl AW1-Puffer befüllt. Nach erneuter einminütiger Zentrifugation mit 8000 rpm kamen 500µl AW2-Puffer hinzu und es erfolgte eine Zentrifugation mit 13000rpm über drei Minuten. Das Eluat wurde wiederum verworfen. Zum Schluss wurde das Spin Column auf ein 1,5ml-Eppendorf-tube gesetzt, mit 200µl AE-Puffer versetzt, bei Raumtemperatur eine Minute inkubiert und bei 8000rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde der besseren Ausbeute wegen wiederholt. Das entstandene Eluat wurde entweder bei -20°C gelagert oder direkt zur PCR verwendet.

2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion

Kary Mullis erfand 1983 die Polymerasekettenreaktion in der heute bekannten Form, wofür er 1993 den Nobelpreis für Chemie verliehen bekam (Brändén, 1993). Er hatte damit ein neuartiges Syntheseverfahren entwickelt, mit dem DNA durch

wiederholte Verdopplung in mehreren Zyklen mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase künstlich vervielfältigt wird. Das Prinzip eines PCR-Zyklus ist dabei

1. Denaturierung: die doppelsträngige DNA wird auf ca. 96°C erhitzt, um die Stränge durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zu trennen.
2. Annealing: Die beiden Primer bekommen durch Herabkühlen der Temperatur auf Werte zwischen 50 und 65°C die Möglichkeit, sich optimal an ihre Zielsequenz anzulagern.
3. Elongation: Die thermostabile taq-DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* liest nun bei 68–72 °C in 3'-5'-Richtung den gewünschten Abschnitt ab und synthetisiert dabei aus den hinzugegebenen dNTPs die DNA in 5'-3'-Richtung, ohne bei der darauf wieder bei 96°C folgenden Strangtrennung zu denaturieren.

Zu Beginn vermehrt sich die Ziel-DNA nahezu exponentiell. Durch das Entstehen von immer mehr Kurzfragmenten sind der PCR nach etwa 35 Zyklen jedoch in der Theorie Grenzen gesetzt, wobei dies problemlos ausreicht, um mehr als die erforderlichen Mengen zu synthetisieren.

2.2.1.3 Anwendung der PCR

Die bereits extrahierte mausspezifische DNA wurde nun mithilfe der PCR vervielfältigt. Dazu wurden 2µl Maus-DNA, 10µl taq-Ready-Mix, jeweils ein 1µl Primer forward und 1µl Primer reverse sowie 6µl Aqua destillata in 0,2ml-Tubes pipetiert. Negativkontrolle war destilliertes Wasser, als Positivkontrolle diente die DNA einer mehrfach positiv auf das entsprechende Zielgen getesteten Maus. Nach dem Einsetzen in den Thermocycler wurde das zum untersuchten Gen passende Programm gestartet:

PCR-Programm für K-ras

<i>Zyklen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
35x	95°C	3,0 min
	94°C	1,0 min
	60°C	2,0 min
	72°C	1,0 min
1x	72°C	3,0 min

PCR-Programm für p53

<i>Zyklen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
35x	95°C	3,0 min
	94°C	0,5 min
	60°C	1,0 min
	72°C	0,5 min
1x	72°C	3,0 min

PCR-Programm für Cre

<i>Zyklen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
35x	95°C	4,0 min
	95°C	0,5 min
	59°C	0,5 min
	72°C	0,5 min
1x	72°C	5,0 min

PCR-Reaktionsansatz je Probe

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Ready Mix (Taq PCR Reaction Mix mit dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	10 µl
dH ₂ O	6 µl
Forward-Primer (20pmol/µl)	1 µl
Reverse-Primer (20pmol/µl)	1 µl
genomische DNA	2 µl

2.2.1.4 Das Agarosegel

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 3,4g Agarose und 170ml zehnfach verdünnter TBE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle ca. drei Minuten geköchelt, bis eine homogene Flüssigkeit entstanden war, die anschließend, mit 15µl Ethidiumbromid versetzt, gleichmäßig und blasenfrei in die mit den Platzhaltern für die Geltaschen versetzte Gelkammer gegossen wurde. Nach etwa 20 Minuten war das Gel

so fest, dass es aus der Kammer entfernt werden konnte. Es wurde dabei darauf geachtet, dass das Gel und die in ihm zurückbleibenden Taschen vollständig mit TBE-Puffer bedeckt waren und die Geltaschen an der negativen Elektrode der Kammer zu liegen kamen.

2.2.1.5 Gelelektrophorese und PCR-Auswertung

Nach dem Durchlaufen der PCR-Zyklen wurden die Proben aus dem Thermocycler entnommen und jede in eine Geltasche pipettiert. In die erste einer Reihe von Geltaschen wurde jeweils ein Längenmarker gegeben. An das Agarosegel wurde dann für 40 Minuten eine Spannung von 130 Volt angelegt. Dabei erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Aufgrund der Einlagerung des Ethidiumbromids konnten nun mithilfe eines UV-Transilluminators die einzelnen Banden sichtbar gemacht, fotografiert und durch das Vergleichen mit dem Längenmarker auf ihre Größe bzw. Ladung hin kontrolliert werden.

2.2.2 Tierversuche

Die Tierversuche erfolgten unter Beachtung geltender Tierschutzgesetze und ethischer Richtlinien (Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen, Geschäftszeichen: V54-19c20-15(1) MR20/16-Nr. 44/2007).

2.2.2.1 Zucht und Haltung der Versuchstiere

Mit dem Ziel, dreifach transgene Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse zu erhalten, wurden in einem Zuchtkäfig jeweils zwei Weibchen mit einem Männchen zusammengesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Männchen zweifach transgene Merkmale aufwies und die Weibchen ebenso, allerdings mit unterschiedlichen Genotypen und ohne dabei Kras mit Cre zu kombinieren, weil darunter die Zuchttiere gelegentlich bereits Pankreaskarzinome entwickeln würden (siehe Kapitel 1.9) (Hingorani et al., 2003). So wurde z. B. ein LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Männchen mit zwei Pdx-1-Cre;LSL-Trp53^{R172H/+}-Weibchen verpaart. Ungefähr jedes achte Jungtier sollte demnach wie erforderlich dreifach transgen sein. Mit den nebenbei entstehenden zweifach-transgenen Mäusen wurden die Zuchtfamilien erhalten und ergänzt.

Die Mäuse wurden in speziellen Käfigen im Tierstall des Biomedizinischen Forschungszentrum der Universität Marburg bei einer Temperatur von 21 (± 1)°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 (± 5)% unter sterilen Bedingungen gehalten. Dort ist ein periodischer Tag- und Nachtrhythmus in zwölf Stunden-Intervallen eingestellt. Die Fütterung erfolgte mit Standardzuchtfutter und Wasser ad libitum. Dreieinhalb Wochen nach der Geburt wurden die Jungtiere nach Geschlechtern getrennt zu maximal sechs Stück auf neue Käfige verteilt und nach vier Wochen mit einer Ohrmarke versehen. Dabei wurde auch die für die Genotypisierung notwendige Schwanzbiopsie entnommen.

2.2.2.2 Versuchsplan

Die gezüchteten dreifach transgenen Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse wurden in vier Gruppen randomisiert. Bei Geschwistern eines Wurfs mit gewünschtem Genotyp bildete die zweite Maus im entsprechenden Kontrollarm ein „Match“, um einen Randomisierungs-Bias zu vermeiden. Entsprechend wurde auch das Geschlechterverhältnis gleich gewichtet.

A) 16 Tiere erhielten zur Induktion einer milden chronischen Pankreatitis eine Caeruleinbehandlung in Kombination mit einer Gemcitabin-Chemotherapie. B) 16 weitere Mäuse bekamen zur Kontrolle dessen nur die Caeruleinbehandlung. C) 11 Mäuse erhielten die Standard-Chemotherapie Gemcitabin. Darüber hinaus wurde D) eine placebo-behandelte Kontrollgruppe mit 10 Tieren geführt.

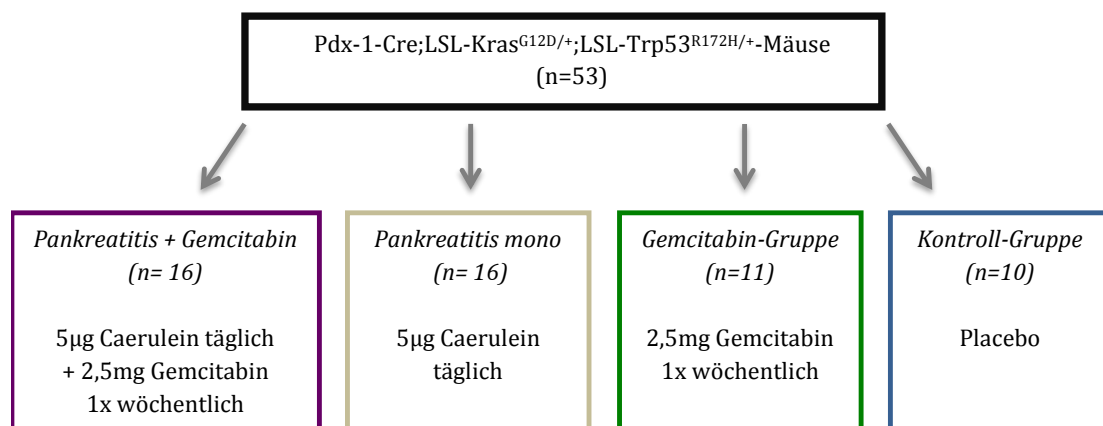


Abb. 6: Versuchsaufbau

2.2.2.3 Ablauf der intraperitonealen Injektionen

Das Chemotherapeutikum Gemcitabin wurde in Anlehnung an Feldmann et al. (2007) in den entsprechenden Gruppen nach Vollendung der zwölften Lebenswoche einmal wöchentlich mit einer Dosierung von 100mg/kg intraperitoneal injiziert. Dies entsprach pro Maus in der Praxis 2,5mg gelöstem Gemcitabin in 0,2ml 0,9-prozentiger Natriumchloridlösung. Das Cholezystokininanalogon Caerulein wurde nach dem Schema von Guerra et al. (2007) täglich vom Beginn der neunten Lebenswoche an in einer Dosis von 5µg in 0,2ml NaCl pro Maus appliziert.

Vor jeder Injektion wurde der Injektionsbereich desinfiziert, so dass die Applikation unter sterilen Bedingungen stattfinden konnte. Die Kontrollgruppe erhielt eine Placebobehandlung mit 0,9-prozentigem Natriumchlorid.

Jede der Behandlungen wurde bis zum Lebensende der Maus fortgeführt.

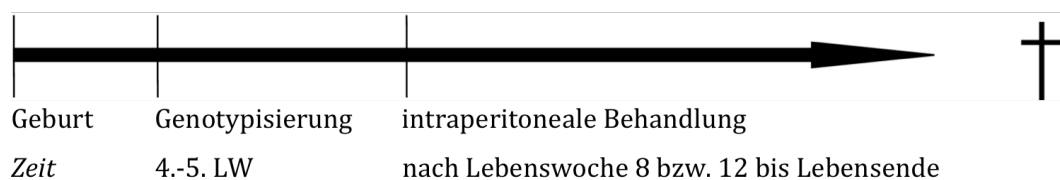


Abb. 7: Applikationsschema der intraperitonealen Injektionen

2.2.2.4 Organ- und Blutentnahme

Hingorani und Kollegen (2005) beschreiben für das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tumormausmodell, wie es bei den transgenen Tieren zur Entwicklung von Aszites kommt. Dieser ist zu erkennen am geblähten und aufgetriebenen Abdomen, woraufhin typischerweise zwischen 48 und 72 Stunden später der natürliche Tod zu erwarten ist. Das sichere Vorliegen dieser Symptome gab also den Anlass, das auffällige Tier nach Sedierung mit Ketamin i.p. durch zervikale Dislokation zu töten. Dann wurden rasch Bauchhöhle und Brustkorb eröffnet und nach Inzision ins Herz das Blut aus dem Thorax herauspipettiert. Zügig wurde nun nach einem Foto des Situs das Pankreas entnommen, fotografiert und in Formalin gegeben. Ein für die RNA-Extraktion bestimmter Teil wurde außerdem in TRIzol fixiert.

2.2.3 Gewebeverarbeitung und Erstellen histologischer Schnitte

Mit Unterstützung des Instituts für Pathologie der Universität Marburg wurden die Formalin-Pankreata nach standardisierter Methode in Paraffinblöcke eingebettet. Anschließend wurden davon am Mikrotom 4µm dicke Serienschritte angefertigt.

2.2.4 Färbungen

2.2.4.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Der jeweils erste Serienschritt eines Pankreas wurde auf seinem Objektträger zweimal für fünf Minuten in Xylol entparaffinisiert und in der absteigenden Ethanolreihe 100%, 85%, 70%, 50% und deionisiertem Wasser für je zwei Minuten rehydriert. Es folgte eine fünfminütige Hämalaun-Färbung nach Mayer mit anschließender Spülung in lauwarmem Wasser für 10 Minuten. Dann wurde die Gegenfärbung mit 0,5-prozentigem Eosin für 30 Sekunden durchgeführt, welches vorher mit einem Tropfen Eisessig versehen worden war. Es folgte eine zweimalige Spülung in dH₂O und eine aufsteigende Ethanolreihe zur Dehydration mit 50% und 70% für je eine Minute, 85% für zwei Minuten und 100% Ethanol für fünf Minuten. Danach wurden die Objektträger zwei Mal fünfminütig in Xylol gestellt, bevor sie mit Histokitt eingedeckelt wurden.

2.2.4.2 Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner

Bei dieser Färbung erfolgt eine differenzierte Darstellung der Bindegewebskomponenten mithilfe von Eisenhämatoxylin, Säurefuchsin, Orange G und Lichtgrün. Dabei imponieren Zellkerne blauschwarz, Zytoplasma rot, Kollagen grün und Muskulatur hellrot. Die Trichromfärbungen wurden freundlicherweise in Kooperation vom Institut für Pathologie der Universität Marburg für die vorliegende Arbeit durchgeführt.

2.2.4.3 Immunohistochemie-Färbungen

Bei der Immunohistochemie werden Proteine mithilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. So lässt sich bestimmen, in welchem Gewebe und in welchem Zellkompartiment ein gesuchtes Protein vorhanden ist und damit auch, wie stark ein zu untersuchendes Gen exprimiert wird.

2.2.4.3.1 Indirekte Methode

Für die vorliegende Arbeit wurde die sogenannte indirekte Methode der Immunohistochemie angewendet. Hierbei wird ein primärer Antikörper auf das zu untersuchende Gewebe aufgetragen, der spezifisch an die Zielstruktur bindet. In einem folgenden Schritt wird dann ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, der sich gegen den primären Antikörper richtet und seinerseits den dann hinzuzugebenden Farbstoff bindet, wodurch die Zielstruktur schließlich sichtbar wird (Ramos-Vara, 2005).

2.2.4.3.2 Durchführung der immunohistochemischen Färbungen

Es wurde die Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode) verwendet (Hsu und Raine, 1981) mit den Komponenten Primärantikörper, biotinyliertem Sekundärantikörper und Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Die das paraffinierte Gewebe tragenden Objektträger wurden wieder zwei Mal für je fünf Minuten entparaffiniert und dann für jeweils zwei Minuten in einer absteigenden Ethanolreihe von 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% und 30% gebadet, bevor sie zwei Mal für zwei Minuten in dH₂O gestellt wurden. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Objektträger nun in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 für 10 Minuten knapp unter dem Siedepunkt in der Mikrowelle erhitzt und anschließend auf Eis für 20 Minuten gekühlt. Es folgte eine dreimalige Spülung für je fünf Minuten in dH₂O. Dann wurde durch die Inkubation mit dreiprozentigem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bei Raumtemperatur die endogene Peroxidase des Gewebes deaktiviert. Nun folgte die Markierung mit einem Spezialstift um das zu untersuchende Gewebe herum, so dass in den folgenden Schritten hinzugegebene Flüssigkeiten nicht von den Objektträgern ablaufen konnten. Durch das Spülen mit PBST (phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween) wurde die Oberflächenspannung reduziert. Es folgte die Inkubation mit Bovine-Serum-Albumin-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur und dann nach mehrmaligem Spülen mit PBST das Auftragen des primären Antikörpers. Über Nacht wurden die Objektträger bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert.

Am zweiten Tag erfolgte zunächst eine dreimalige fünfminütige Spülung mit PBST, um den überstehenden primären Antikörper sicher zu entfernen. Jetzt wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen und wiederum für eine Stunde bei Raumtempe-

ratur inkubiert, bevor er durch PBST-Spülung entfernt wurde. Nun kam das ABC-Kit hinzu und wurde ebenfalls eine Stunde lang inkubiert. Nach der wiederholten PBST-Spülung wurde jeder Objektträger unter Sicht einzeln am Mikroskop mit DAB-Chromogen (Diaminobenzidin) gefärbt, um die Antigen-Antikörper-Bindungsstellen sichtbar zu machen. Bei optimaler Braunfärbung wurde die Reaktion sofort mit dH₂O gestoppt. Im Anschluss folgte die Gegenfärbung mit Hämalaun für 15 Sekunden mit anschließendem „Bläuen“ unter fließendem lauwarmem Wasser für fünf Minuten. Danach wurde zwei Mal in dH₂O gespült, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Anschließend wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, und 100% für jeweils 45 Sekunden dehydriert und im Anschluss zwei Mal fünf Minuten in Xylol gestellt. Zum Schluss wurde das Gewebe mit Histokitt eingedeckelt.

2.2.5 Blutserumanalysen

Nach der Blutentnahme in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde dieses eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 1.100 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das dabei gewonnene Serum wurde vorsichtig abpipettiert und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei -20°C eingefroren.

2.2.5.1 ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist die Bezeichnung für ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren. Mithilfe einer enzymatischen Farbreaktion können unter anderem Proteine wie z. B. Cytokine quantitativ nachgewiesen werden.

Beim sogenannten Sandwich-ELISA werden zwei Antikörper verwendet, welche beide gezielt an verschiedenen Stellen des Antigens binden. Als erstes wird der *Coating*-Antikörper auf speziellen Mikrotiterplatten fixiert. Dann wird die Probe mit dem zu messenden Antigen hinzu pipettiert und für eine Weile inkubiert. Währenddessen bindet der Coating-Antikörper das Antigen. Anschließend wird die Platte gewaschen und somit von ungebundenen Bestandteilen befreit.

Im zweiten Teil wird der *Detection*-Antikörper hinzugegeben, der nun ebenfalls an seine Zielstruktur bindet. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex – daher der Name Sandwich-ELISA.

An den Detection-Antikörper ist ein Enzym wie beispielsweise Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Wenn nun ein passendes chromogenes Substrat hinzugegeben wird, katalysiert dieses dessen Farbumschlag, der dann photometrisch quantifiziert werden kann (Perry et al., 2002).

2.2.5.2 Partikelbasierte FACS-Assays

Fluorescence-activated cell sorting (FACS®) der Firma Becton Dickinson ist eine Form der Durchflusszytometrie. Dabei können Oberflächenmoleküle, intrazelluläre Proteine, Peptide oder auch DNA quantitativ untersucht werden. Fluoreszenz-Farbstoffe binden entweder direkt an die Zielstrukturen oder werden an spezifische Antikörper gekoppelt, welche an die gewünschten Antigene binden. Diese werden dann abhängig von ihrer Fluoreszenz-Färbung im Durchflusszytometer sortiert (Loken, 1990).

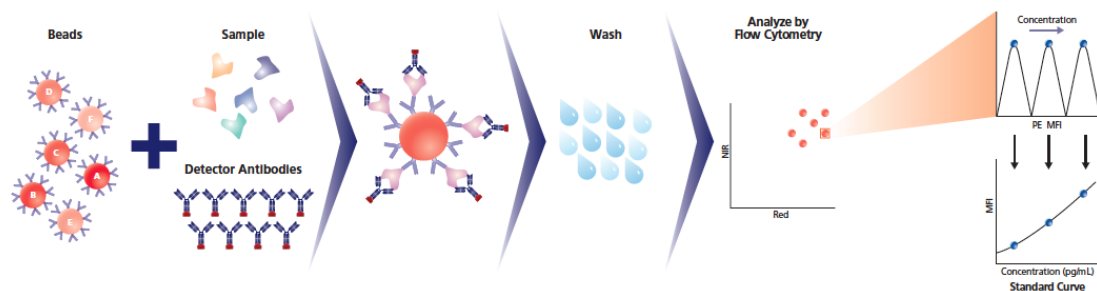


Abb. 8: Prinzip des FACS-Assays (Reynolds et al., 2012)

2.2.5.3 Durchführung des ELISAs CRP und der FACS-Assays IL-1 α , IL-6 sowie IL-10, Interferon- γ und Macrophage Inflammatory Protein-1 α

Die folgenden Schritte der Serumanalyse wurden in Kooperation mit Dr. rer. nat. Christoph Hudemann vom Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Die CRP-Serumspiegel wurden mit dem Mouse c-reactive protein (CRP) ELISA test kit von Life Diagnostics, Inc. analysiert. Nach der Zugabe des konjugierten Anti-Maus-CRP-Antikörpers wurden die Proben 45 Minuten lang inkubiert. Nach dem Waschen kam der Meerrettich-Peroxidase-Antikörper HRP (horseradish peroxidase) für 45 Minuten hinzu, wodurch man das „Sandwiching“ induziert. Anschlie-

ßend wurden die Wells gewaschen, das Chromogen TMB Reagent hinzugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dies resultierte in einer Blaufärbung, welche durch die Hinzugabe der Stop-Lösung (1N HCl) in ein Gelb umschlug, das nun spektrophotometrisch bei 450 Nanometern gemessen wurde. Die FACS-Assays für Interleukin-1 α und Interleukin-6 sowie Interleukin-10, Interferon- γ und Macrophage Inflammatory Protein-1 α wurden mit dem BD CBA Multiplexed Bead-Based Immunoassay nach Anleitung des Master Buffer Kit manual durchgeführt.

2.2.6 Analyse der STAT3-Phosphorylierung durch Interleukin-6 in vitro

Die folgenden Zellkultur-Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. rer. nat. Matthias Lauth vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Humane PaCa44 PDAC-Zellen wurden auf 6-Well-Platten gegeben, um über Nacht zu adhären. Anschließend wurden die subkonfluenten Zellen mit PBS gewaschen und im Nährmedium, bestehend aus 0,5-prozentigem FBS (Fötales bovines Serum), DMEM high Glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Natrium-Pyruvat und Penicillin/Streptomycin kultiviert. In den Experimentalgruppen wurden 1 μ M Gemcitabin plus/minus rekombinantes humanes Interleukin-6 für die Dauer von 72 Stunden hinzugegeben. Dann wurde das o. g. „low serum“ entfernt und die Zellen für sechs Tage in einem „full growth medium“, bestehend aus 10-prozentigem FBS plus/minus IL-6 (20ng/ml), kultiviert. Schließlich wurden die Zellen trypsinisiert und automatisiert ausgezählt.

Die gewonnen Rohwerte wurden anhand standardisierter unbehandelter Kontrollen normiert.

Der Grad der Phosphorylierung von STAT3 wurde mittels Western Blot gemessen, wobei β -Actin als Kontrolle fungierte.

2.2.7 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mit den Programmen Microsoft Excel für Mac (Version 2011) und SPSS (Version 15.0) ausgewertet. Für quantitative Größen wurde bei allen deskriptiven Statistiken der Mittelwert, der Median und die Standardabweichung bestimmt.

Die Signifikanztestung zwischen den einzelnen Versuchsgruppen erfolgte mithilfe des t-Tests und des Levene-Test. Die graphische Auswertung der Überlebenskurven wurde mit der Methode nach Kaplan-Meier durchgeführt.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt definiert:

Signifikant entspricht $p < 0,05$

Nicht signifikant entspricht $p > 0,05$

3. Ergebnisse

3.1 Die Zucht der Mäuse führt zum gewünschten Genotyp

Die in der Arbeitsgruppe vorhandenen zweifach transgenen Zuchtmäuse wurden parallel auf bis zu 80 Elterntiere aufgestockt, um die Zucht, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, zügig und produktiv voranzutreiben. Die Jungen wurden mithilfe der PCR genotypisiert. Dabei war in der Praxis etwa jede zehnte Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Maus wie gewünscht dreifach transgen und nicht, wie erwartet, jede achte. Für diese experimentelle Arbeit wurden also rund 500 Mäuse geboren.

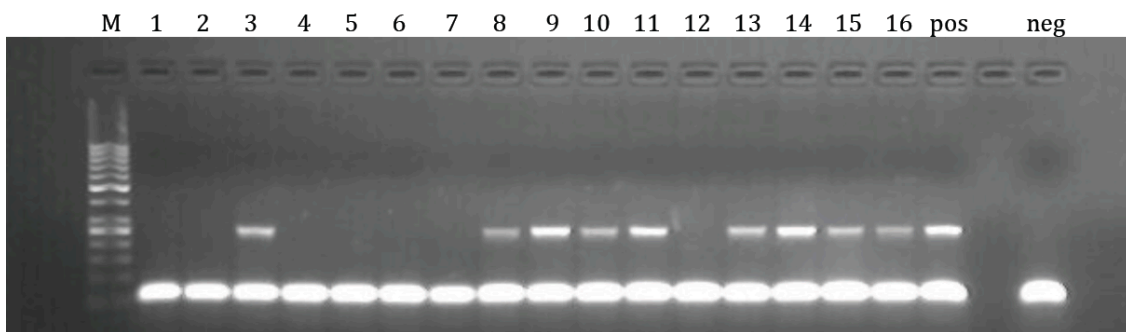


Abb. 9: Auswertung des Agarosegels einer p53-PCR vom 27.07.2010 (M=Marker, 1-16 untersuchte Proben, pos=Positivkontrolle, neg = Negativkontrolle mit H₂O). Die Proben 3, 8-11, 13-16 sind positiv, die restlichen entsprechen dem p53-Wildtyp.

Die Behandlung verlief in allen Gruppen problemlos und es ging kein Tier durch eventuelle Verletzungen bei der intraperitonealen Applikation der jeweiligen Medikamente verloren. Aufgrund der Notwendigkeit des für Caerulein täglich zu applizierenden Spritzschemas war es mit keinem großen Mehraufwand verbunden, die Versuchstiere täglich zu inspizieren, so dass die in Kapitel 2.2.2.4 beschriebenen präfinalen Auffälligkeiten, insbesondere das geblähte und aufgetriebene Abdomen bei ausgeprägter Kyphose, Gangunsicherheit und Adynamie mit fast permanent verschlossenen Augen, sicher und rechtzeitig erkannt werden konnten.

3.2 Der Genotyp *Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* induziert makroskopisch sichtbare invasive Pankreaskarzinome

Von den *Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Tieren, die seziert wurden, hatten 94 Prozent zum Zeitpunkt ihres Todes ein makroskopisch sichtbares invasives Pankreaskarzinom mit weißlich-derber Struktur entwickelt. Damit konnten die Ergebnisse von Hingorani und Kollegen reproduziert werden, die in ihren Daten eine Rate von 96 Prozent angeben (2005). Die post mortem wiederholte Typisierung bestätigte jeweils die Dreifachtransgenität. Darüber hinaus konnte bei einem Teil der Tiere, wie auch durch die Erstbeschreiber erwähnt, als Nebenfund die Entstehung mukokutaner Papillome beobachtet werden. Bei den meisten Tieren fanden sich zusätzlich Spleno- und Hepatomegalien, Peritonealkarzinosen oder Lebermetastasen sowie andere intraabominale Organveränderung. Bei weiblichen Mäusen kam es gehäuft zum inkarzerierten Analprolaps, was u. U. in einigen Fällen zum frühzeitigen Tod führte, wenngleich trotzdem auch bei diesen Tieren bereits ein Pankreaskarzinom bestand. Damit konnten vorangegangene Ergebnisse der Arbeitsgruppe reproduziert werden (Fendrich et al., 2010; Plassmeier et al., 2013).

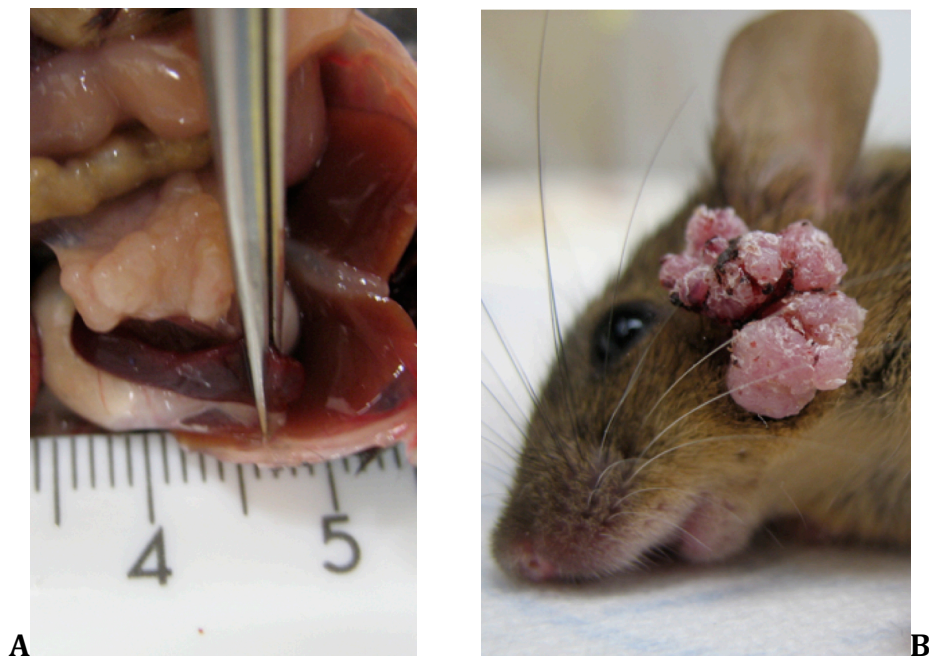


Abb. 10: A makroskopisch sichtbares, als feste derbe Struktur imponierendes Pankreaskarzinom der Maus PG 5591 aus der Pankreatitis-Gemcitabin-Gruppe

B mukokutanes Papillom

3.3 Der Genotyp *Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* induziert mikroskopisch nachweisbare invasive Pankreaskarzinome

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung sieht man bei jenen 94 Prozent der Tiere fortgeschrittene, den humanen Varianten entsprechende Vorläuferläsionen und Pankreaskarzinome. Diese imponieren durch kubische Tumorzellen mit runden Kernen und deutlichen Nukleoli. Zahlreiche, in Größe und Form variierende atypische Drüsen wachsen interstitiell in das Pankreasgewebe ein. In der Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner mit Eisenhämatoxylin, Säurefuchsin, Orange G und Lichtgrün findet darüber hinaus die differenzierte Anfärbung von Bindegewebskomponenten statt, wodurch der Stromareichtum und die Desmoplasie der duktaalen Pankreaskarzinome nochmals besonders deutlich wird.

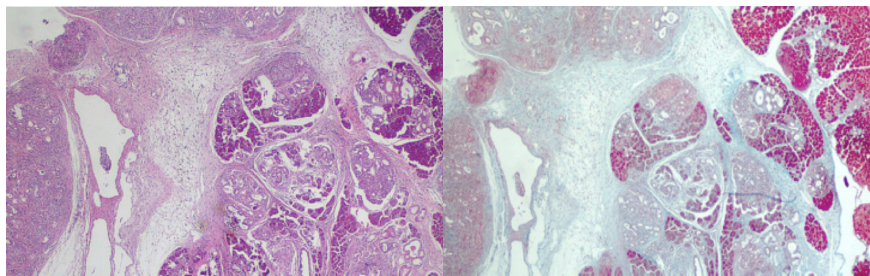


Abb. 11: Hämatoxylin-Eosin- (links) und Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner (rechts) in 2,5-facher Vergrößerung am Beispiel der Maus G6343 aus der Gemcitabin-mono-Gruppe.

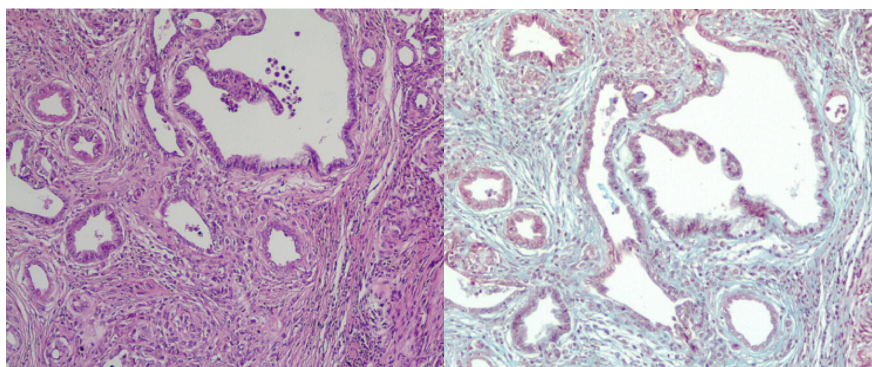


Abb. 12: Hämatoxylin-Eosin- (links) und Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner (rechts) der Maus G6343 in 10-facher Vergrößerung.

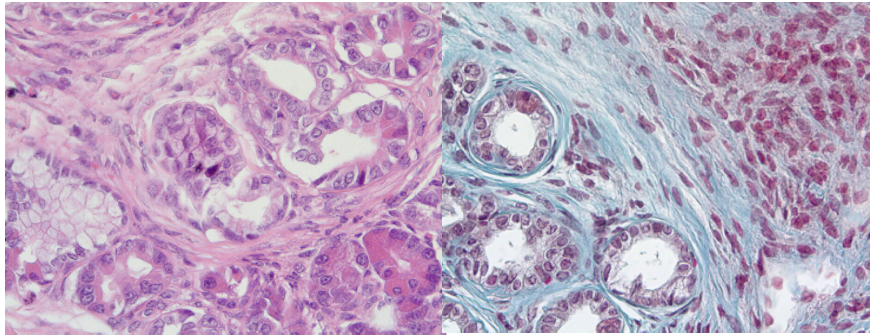


Abb. 13: Hämatoxylin-Eosin- (links) und Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner (rechts) der Maus G6343, hier in 40-facher Vergrößerung. Zu sehen ist ein teilweise noch differenziertes duktales Adenokarzinom des Pankreas. Die gangartige Struktur weist atypisches mehrschichtiges und polymorphzelliges Epithel auf.

3.4 Das Gesamtüberleben nach Gruppen: unter milder chronischer Pankreatitis geht der Nutzen einer Gemcitabin-Therapie verloren

Der primäre Endpunkt und damit wichtigstes Ergebnis dieser Arbeit ist der Vergleich des Gesamtüberlebens der Mäuse nach Gruppenzugehörigkeit.

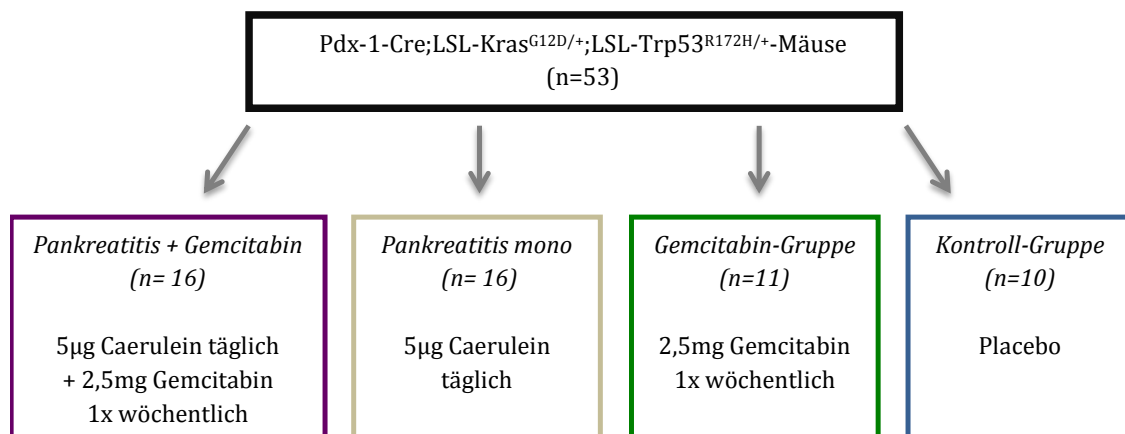


Abb. 14: Versuchsaufbau

Die Gemcitabin-mono-Gruppe erreichte wie in Tabelle 2 zu sehen ein medianes Gesamtüberleben von 183 Tagen. Die Kontrollgruppe lebte im Median 132 Tage, die Caerulein-mono-Gruppe 136 Tage und die Caerulein-Gemcitabin-Gruppe 121 Tage. Gemcitabin als Monotherapie verlängerte also erwartungsgemäß die Überlebenszeit mit einem Pankreaskarzinom. Litten die Tiere jedoch gleichzeitig

unter der milden chronischen Pankreatitis, brachte Gemcitabin keinen Vorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens. Im Gegenteil lebten die Mäuse hierunter sogar am kürzesten (121 Tage) von allen Gruppen. Die Tiere in der Caerulein-mono-Gruppe lebten etwa gleich lang wie die Kontrollmäuse, was eine erhöhte Letalität durch die Gabe von Caerulein unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Tabelle 2: Überlebenstage nach Gruppen

	Mittelwert (Tage)	Median (Tage)
Gemcitabin + Caerulein	135,88	121,0
Caerulein	137,19	136,5
Gemcitabin	201,27	183,0
Kontrolle	136,00	132,0

In den Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben zeigte sich folgendes Bild:

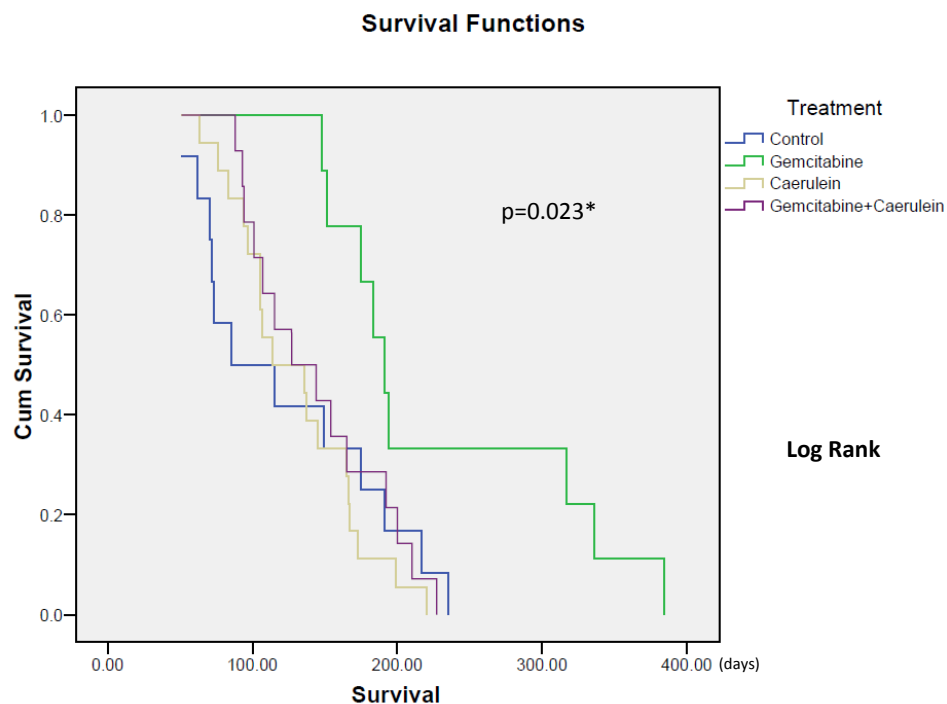


Abb. 15: Log Rank-Darstellung der Überlebenskurven der 4 Gruppen

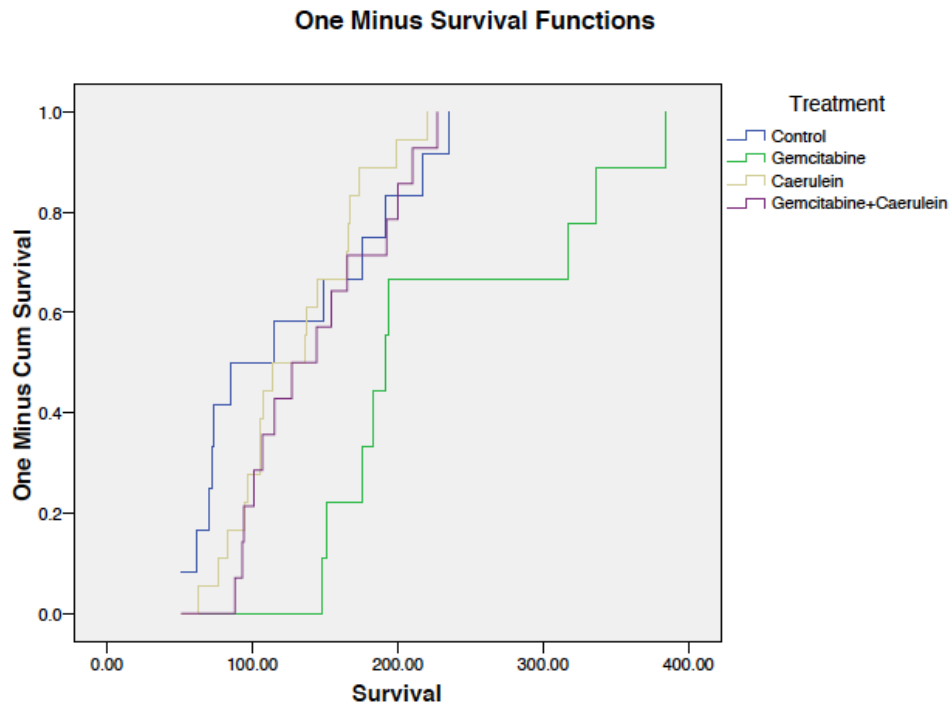


Abb. 16: Überlebenskurven der 4 Gruppen One Minus Survival Function

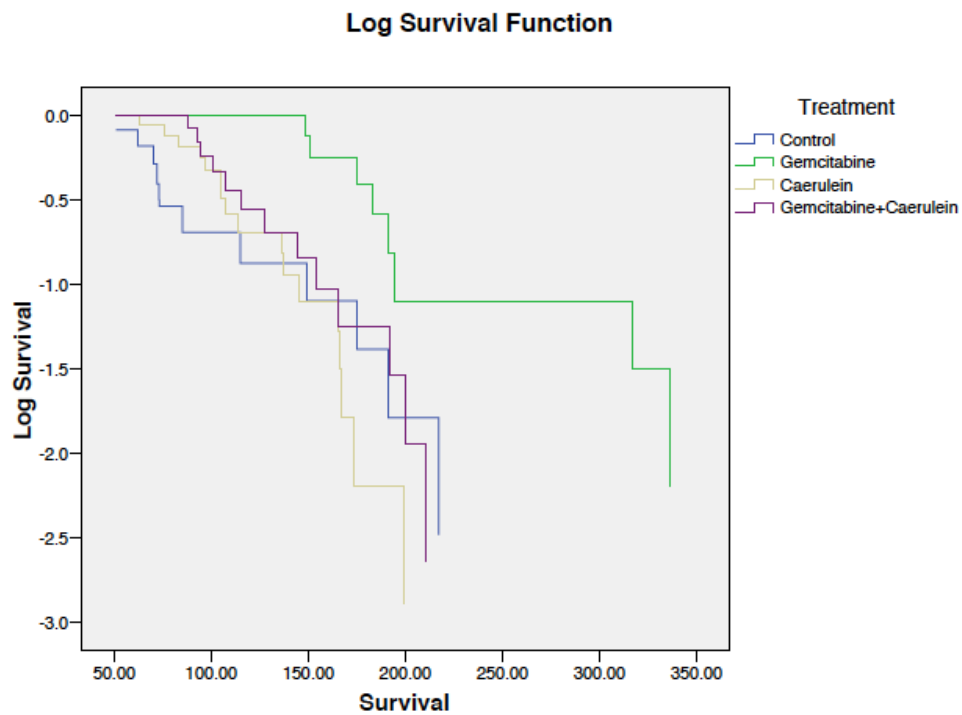


Abb. 17: Überlebenskurven der 4 Gruppen Kaplan-Meier Log Survival Function

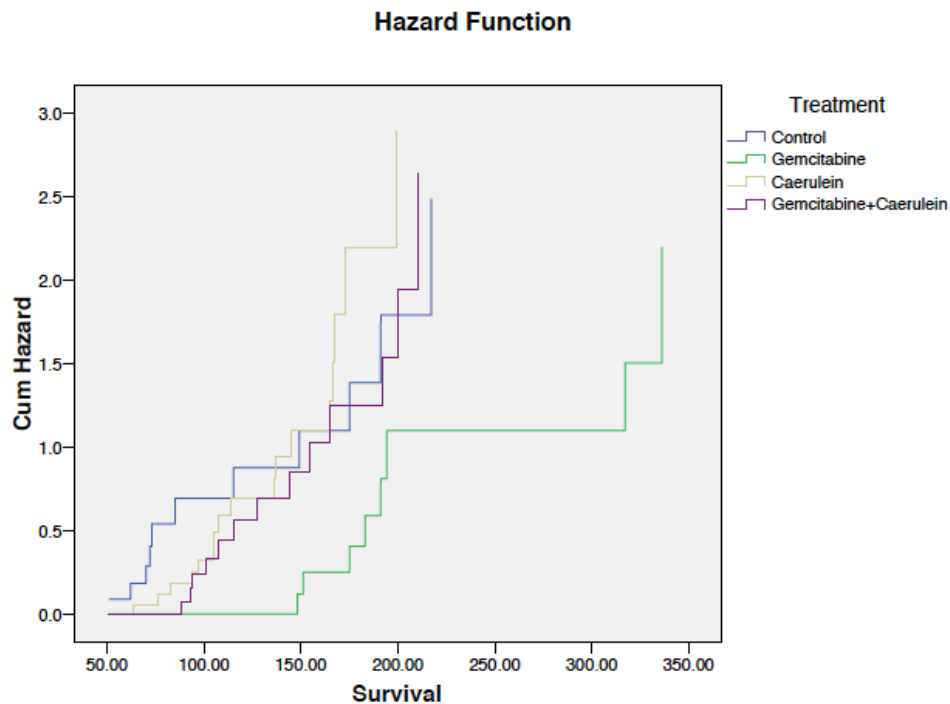


Abb. 18: Überlebenskurven der 4 Gruppen Kaplan-Meier Hazard Function

3.5 Evaluation der chronischen Caerulein-induzierten Pankreatitis

Die Anwendung von Caerulein zur Induktion einer chronischen Pankreatitis im Mausmodell verlief reibungslos, wobei aus Gründen der besseren Handhabung statt der von Guerra verwendeten Konzentration von 50µg/ml physiologischer Kochsalzlösung eine Verdünnung von 25µg/ml gewählt wurde, so dass die vorgesehene Menge von 5µg Caerulein in einen Injektionsvolumen von 0,2ml statt 0,1ml Natriumchlorid intraperitoneal appliziert werden konnte.

3.5.1 Die chronische Caerulein-Pankreatitis ist histologisch nachweisbar

3.5.1.1 Hämatoxylin-Eosin- und Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

In den histologischen Präparaten zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Gemcitabin-mono- und der Kontrollgruppe. Wurden jedoch die beiden in dieser Hinsicht homogenen Non-Pankreatitisgruppen mit den Caerulein-Gruppen verglichen, konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden. So fanden sich bei letztgenannten Gruppen sogenannte acinar dropouts, Atrophien des Drüsengewebes, Fibrose und vor allem Zeichen chronischer Inflammation in Form von eingewan-

derten Entzündungszellen, wie z. B. zahlreichen Granulozyten. Diesbezüglich gli-
chen sich die Caerulein-mono-Gruppe und die Caerulein-Gemcitabin-Gruppe.

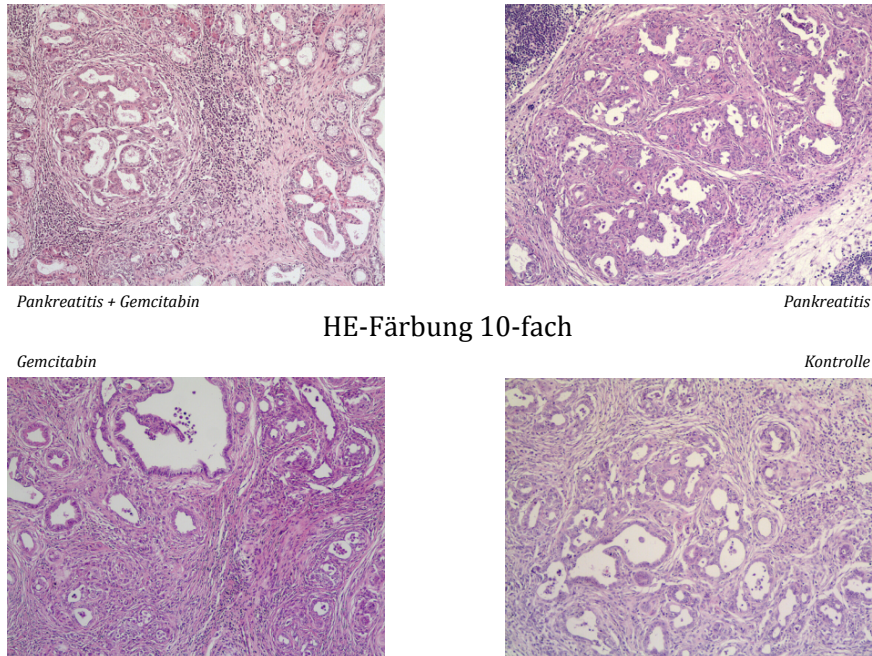


Abb. 19: Gruppenvergleich Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 10-facher Vergrößerung

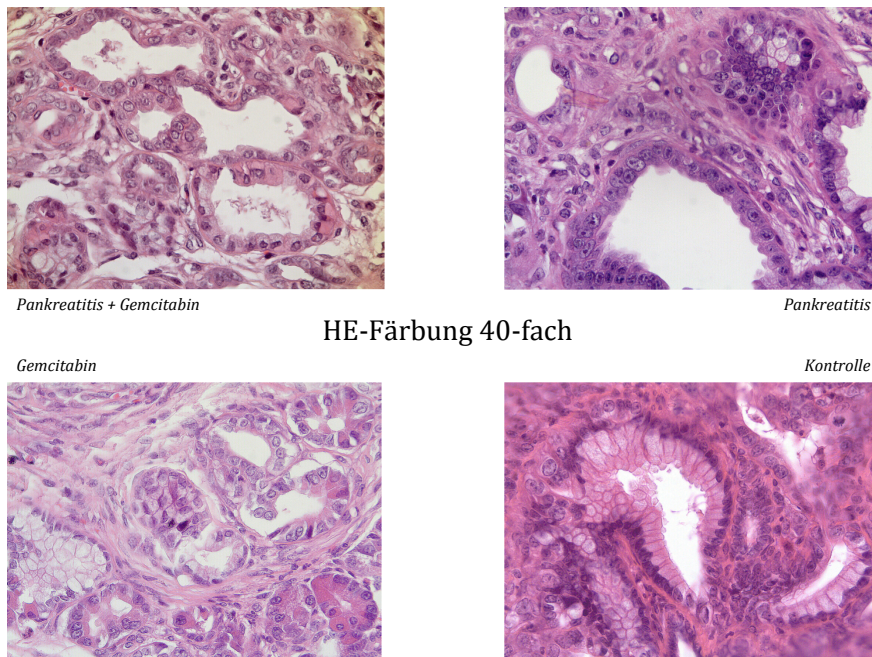
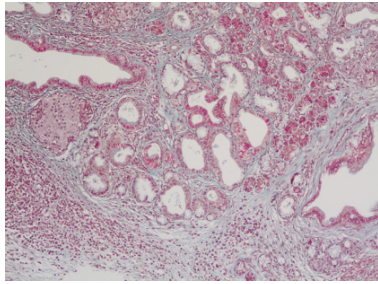
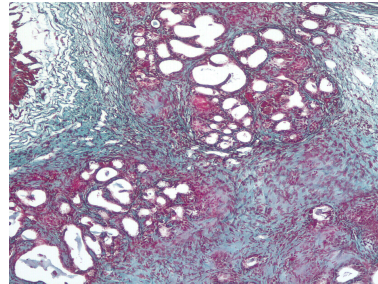


Abb. 20: Gruppenvergleich Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 40-facher Vergrößerung



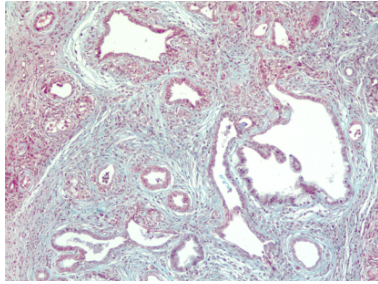
Pankreatitis + Gemcitabin



Pankreatitis

Masson-Goldner 10-fach

Gemcitabin



Kontrolle

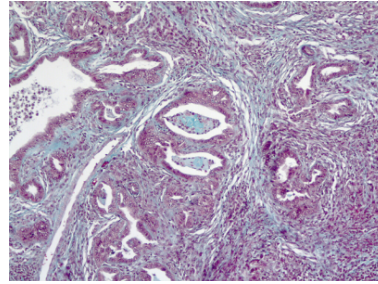
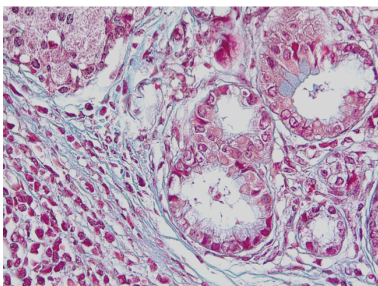
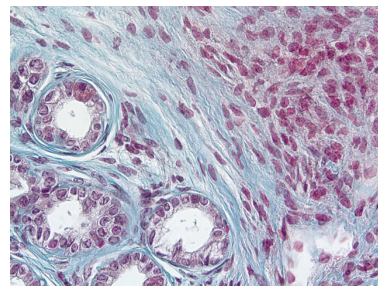


Abb. 21: Gruppenvergleich Masson-Goldner-Färbung in 10-facher Vergrößerung



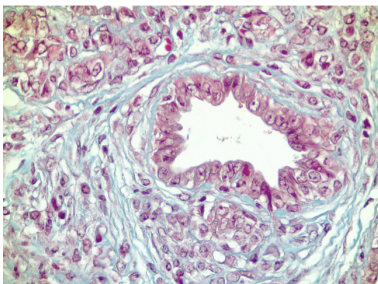
Pankreatitis + Gemcitabin



Pankreatitis

Masson-Goldner 40-fach

Gemcitabin



Kontrolle

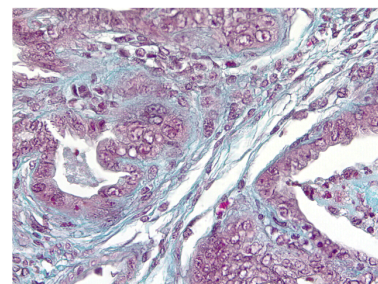


Abb. 22: Gruppenvergleich Masson-Goldner-Färbung in 40-facher Vergrößerung

3.5.2 Die chronische Caerulein-Pankreatitis ist serologisch nachweisbar

3.5.2.1 IL-1 α , IL-6 und CRP zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen

Hier präsentierte sich ein deutliches Bild für Interleukin-1 α , Interleukin-6 und CRP, da diese Biomarker als Surrogatparameter für die chronische Pankreatitis in beiden Caerulein-behandelten Gruppen signifikant erhöht waren im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Diese Erhöhung war unabhängig davon, ob Gemcitabin gegeben wurde. So gab es keine wesentlichen Verschiedenheiten der Serumspiegel zwischen der Caerulein-mono-Gruppe und der Caerulein-Gemcitabingruppe. Auch die Gemcitabin-mono- und die Kontrollgruppe zeigten keinen Unterschied bei den Inflammations-Markern.

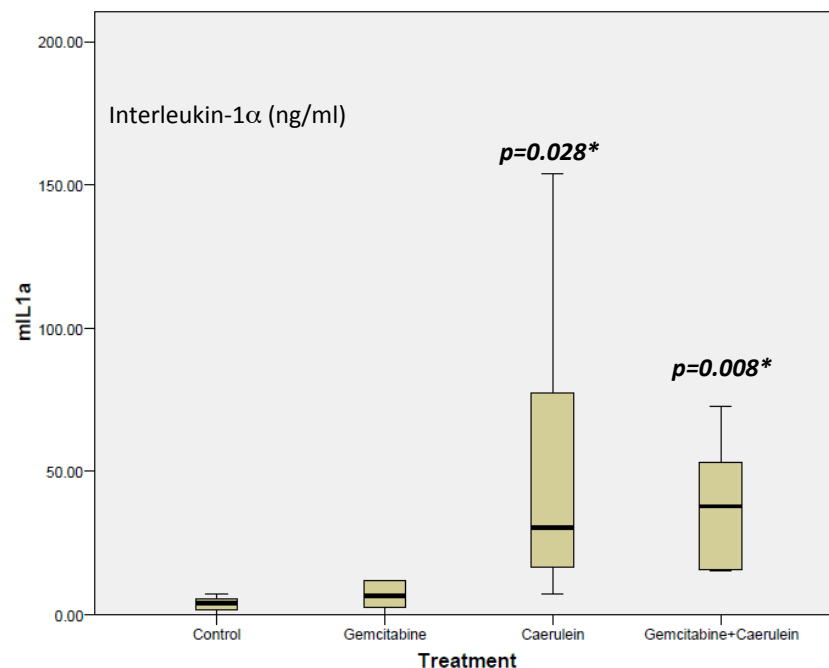


Abb. 23: Interleukin-1 α Balkendiagramm. Stellt man die beiden Non-Pankreatitisgruppen (Control und Gemcitabine) den Caeruleingruppen gegenüber, zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede bei den Serumspiegeln des Entzündungsmarkers Interleukin-1 α .

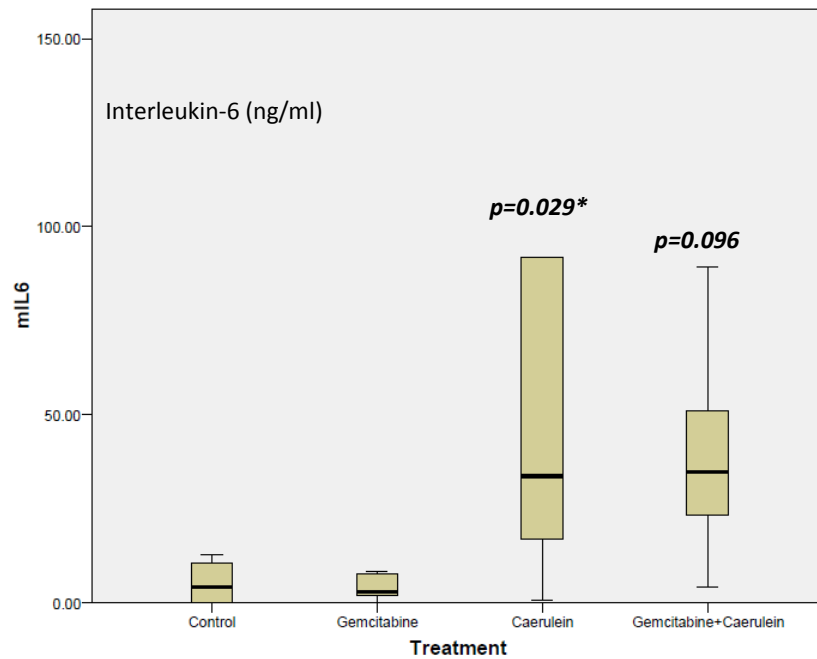


Abb. 24: Interleukin-6 Balkendiagramm. Ebenso finden sich signifikante Unterschiede bei den Serumspegeln von Interleukin-6, wenn man die beiden Non-Pankreatitisgruppen (Control und Gemcitabine) mit den Caeruleingruppen vergleicht.

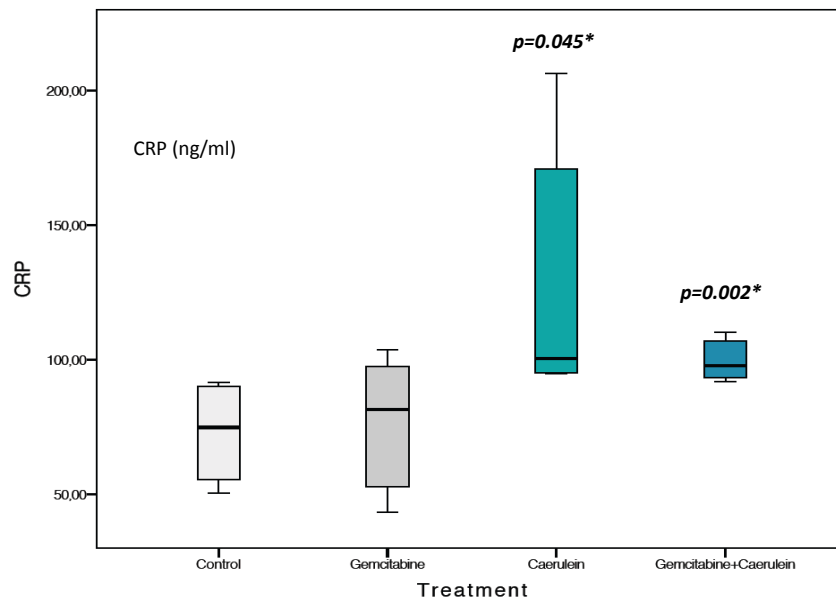


Abb. 25: CRP Balkendiagramm. Stellt man erneut die beiden Non-Pankreatitisgruppen (Control und Gemcitabine) den Caeruleingruppen gegenüber, präsentieren sich auch in Bezug auf die Serumspegel des C-reaktiven Proteins statistisch signifikante Unterschiede.

3.5.2.2 IL-10, Interferon- γ und Macrophage Inflammatory Protein-1 α

Neben Interleukin-1 α , Interleukin-6 und C-reaktivem Protein wurden mit Interleukin-10, Interferon- γ und Macrophage Inflammatory Protein-1 α noch weitere Entzündungsmarker untersucht, bei denen jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten.

3.6 Interleukin-6 und PaCa44-Zellen bei Gemcitabin-Exposition *in vitro*

Als kultivierte humane PaCa44-Zellen wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben mit rekombinantem Interleukin-6 beimpft wurden, zeigte sich, obwohl diese IL-6-responsiv waren, gegenüber der Kontrollgruppe ein allenfalls geringfügig erhöhtes Zellwachstum (siehe Abb. 26).

Im Gegensatz dazu erhöhte exogen hinzugefügtes IL-6 in Anwesenheit von Gemcitabin die Zellzahl signifikant, verglichen mit der nur mit Gemcitabin behandelten Zellkultur.

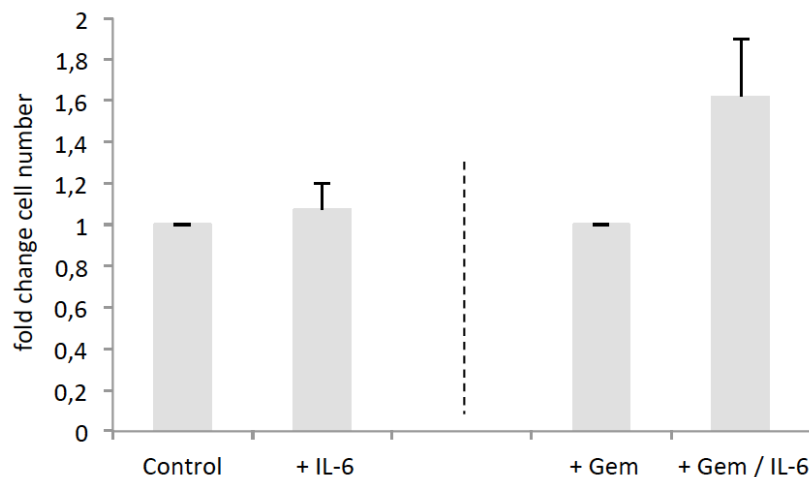


Abb. 26: Abgebildet sind auf den Balken die relativen Unterschiede in der Zellzahl ($n = 3$; Mittelwert \pm Standardabweichung) nach Hinzugabe von IL-6 (20ng/ml) zur Kontrollgruppe bzw. Gemcitabin-exponierten (1 μ M) humanen PaCa44-Zellen. Dabei ist ganz rechts das deutlich stärkere Zellwachstum bei gleichzeitiger Anwesenheit von Gemcitabin und IL-6 erkennbar.

3.7 Interleukin-6 induziert STAT3-Phosphorylierung *in vitro*

Unter Exposition von rekombinantem humanem Interleukin-6 stieg der Anteil an phosphoryliertem STAT3 (p-STAT3) in PaCa44-Zellen mit einem Maximum zwischen 10 und 30 Minuten signifikant an, zu sehen in der folgenden Abb. 27.

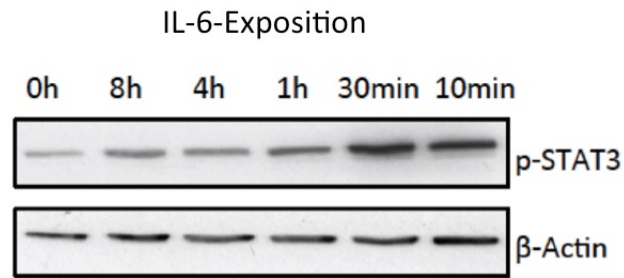


Abb. 27: Induktion von phosphoryliertem STAT3 (p-STAT3) durch rekombinantes humanes IL-6 (20ng/ml) zu den jeweils angegebenen Zeiten in PaCa44-Zellen im Western Blot. β-Actin wurde als Loading-Kontrolle verwendet. Man sieht ein Maximum bei 10 bzw. 30 Minuten.

3.8 Immunohistochemische Auswertung

3.8.1 p-STAT3

p-STAT3, die phosphorylierte Form des in Kapitel 1.6.4 beschriebenen Proteins, war zwar in allen Pankreaskarzinomen der untersuchten Mäuse zu finden, wurde aber in den Pankreata der beiden mit Caerulein behandelten Gruppen stärker exprimiert als in der Gemcitabin-mono- bzw. Kontrollgruppe (siehe Abb. 28).

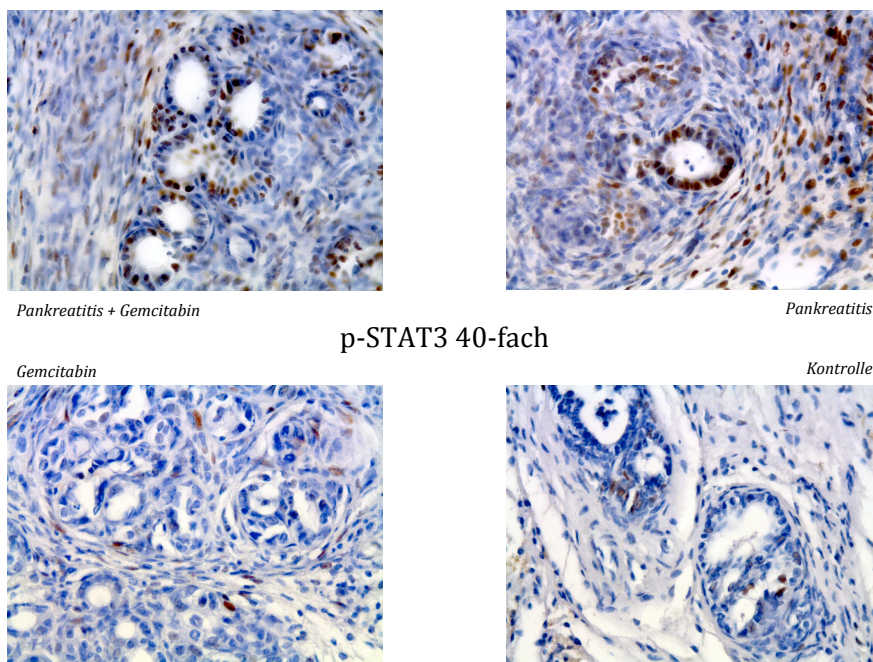


Abb. 28: p-STAT3 in 40-facher Vergrößerung. Man sieht die Über-Expression in den Pankreatitis-Gruppen oben links und rechts gegenüber der geringeren Aktivität in den übrigen Gruppen unten.

3.8.2 Interleukin-6

In der immunohistologischen Anfärbung von Interleukin-6 fallen anders als erwartet keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

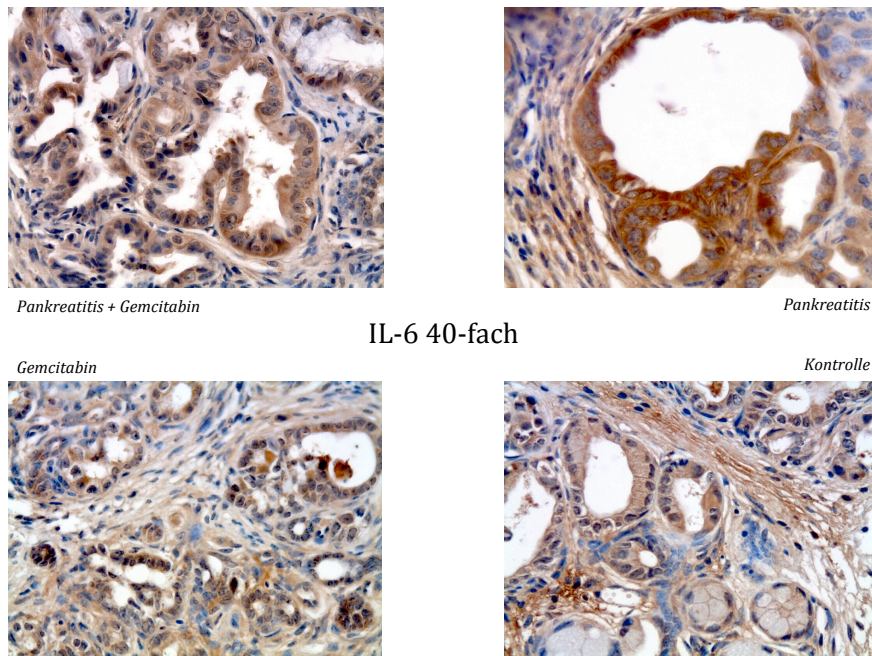


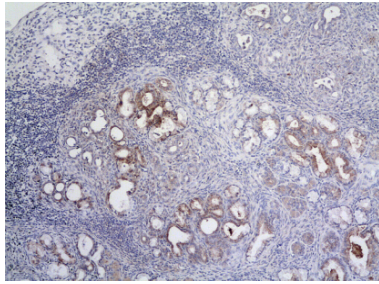
Abb. 29: Interleukin-6 in 40-facher Vergrößerung. Es imponieren anders als erwartet keine Unterschiede zwischen den vier Gruppen.

3.8.3 Sonic Hedgehog

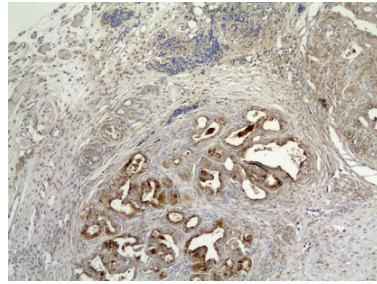
Es wurde immunhistologisch eine verstärkte Expression von Sonic Hedgehog im Stroma der Caerulein-mono-Gruppe beobachtet (siehe *Pankreatitis* in Abb. 30 und Abb. 31.).

3.8.4 Nestin

In der immunohistochemischen Darstellung von Nestin ließ sich in der Caerulein-mono-Gruppe (*Pankreatitis* in Abb. 32 und Abb. 33) eine Hochregulierung in den mesenchymalen periacinären Zellen beobachten.



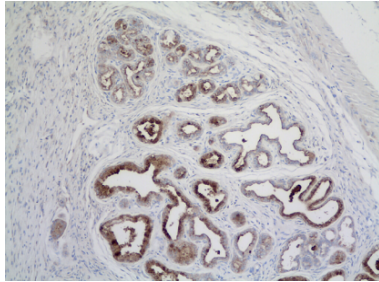
Pankreatitis + Gemcitabin



Pankreatitis

Shh 10-fach

Gemcitabin



Kontrolle

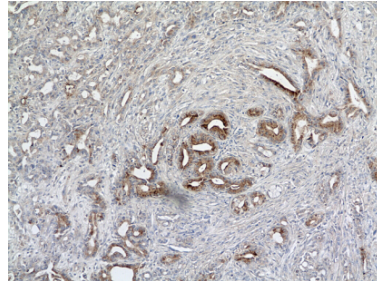
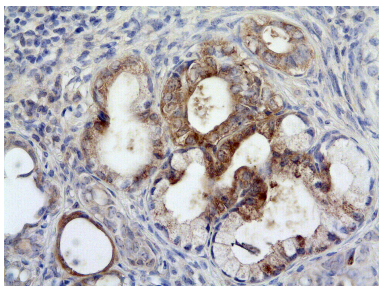
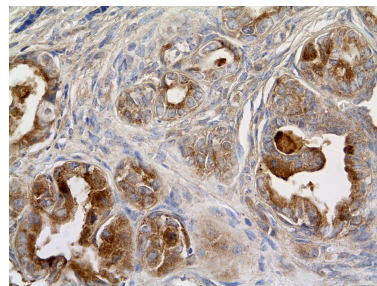


Abb. 30: Sonic Hedgehog in 10-facher Vergrößerung



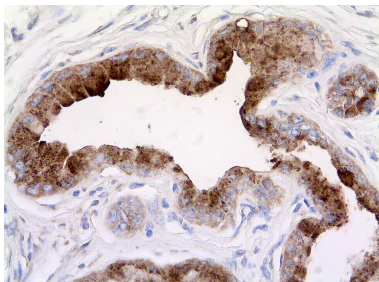
Pankreatitis + Gemcitabin



Pankreatitis

Shh 40-fach

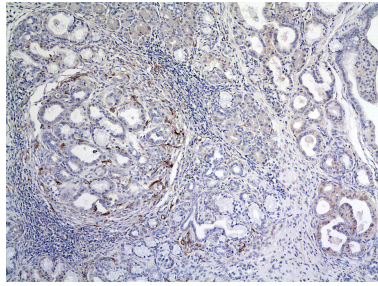
Gemcitabin



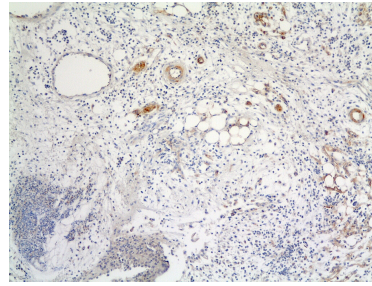
Kontrolle



Abb. 31: Sonic Hedgehog in 40-facher Vergrößerung



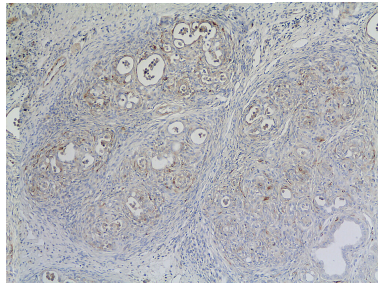
Pankreatitis + Gemcitabin



Pankreatitis

Nestin 10-fach

Gemcitabin



Kontrolle

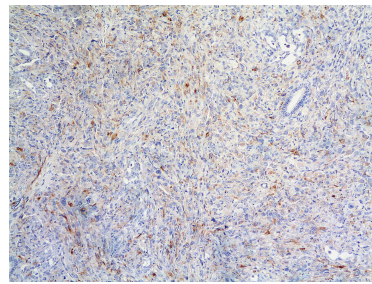
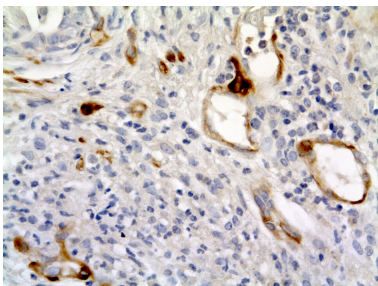
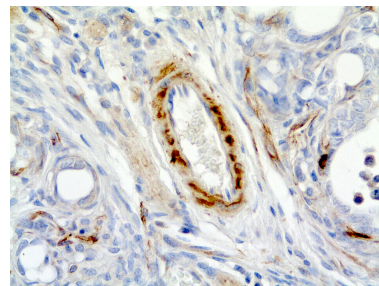


Abb. 32: Nestin in 10-facher Vergrößerung



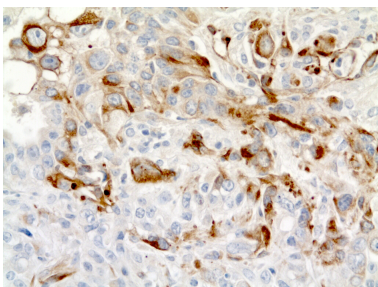
Pankreatitis + Gemcitabin



Pankreatitis

Nestin 40-fach

Gemcitabin



Kontrolle

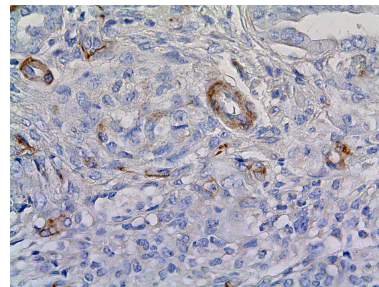
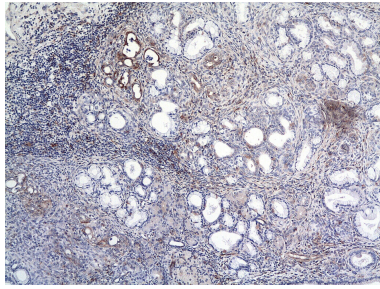


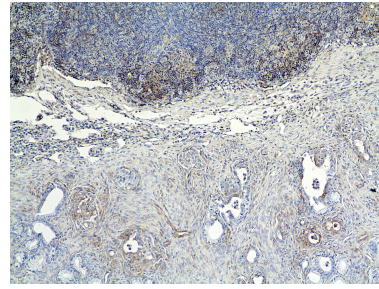
Abb. 33: Nestin in 40-facher Vergrößerung

3.8.5 NF- κ B

In allen vier Gruppen wurde NF- κ B kräftig exprimiert, es zeigten sich jedoch keine relevanten Unterschiede, wie in Abb. 34 und Abb. 35 zu sehen ist.



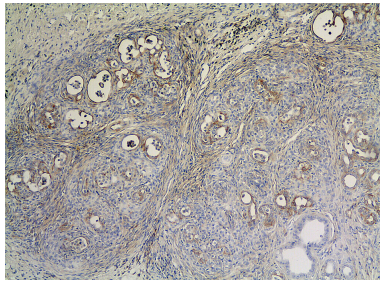
Pankreatitis + Gemcitabin



Pankreatitis

NF-κB 10-fach

Gemcitabin



Kontrolle

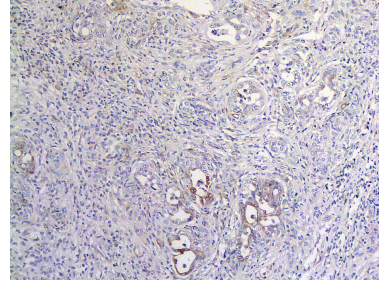
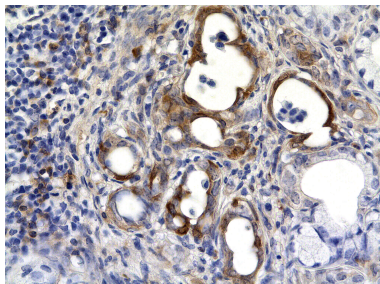
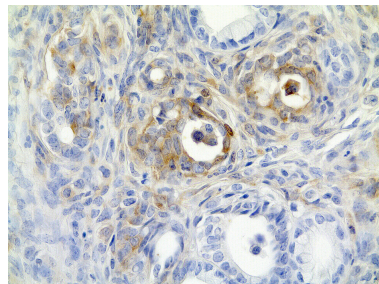


Abb. 34: NF-κB in 10-facher Vergrößerung



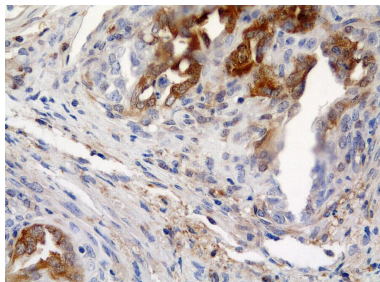
Pankreatitis + Gemcitabin



Pankreatitis

NF-κB 40-fach

Gemcitabin



Kontrolle

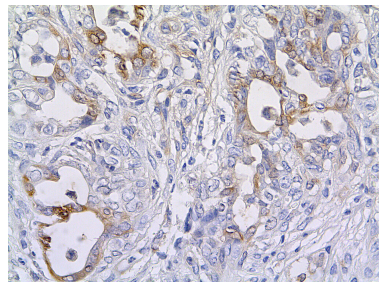


Abb. 35: NF-κB in 40-facher Vergrößerung

3.8.6 Amylase

Bei der Immunohistochemie von Amylase als wichtigem Marker der exokrinen Pankreasfunktion zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im Gruppenvergleich. Siehe Abb. 36 und Abb. 37.

3.8.7 Pdx-1

Der im Rahmen zunehmender maligner Entartung nicht nur im endokrinen, sondern auch im exokrinen Pankreas vorhandene Transkriptionsfaktor Pdx-1 ließ sich reichlich anfärben und zeigte, wie in Abb. 38 und Abb. 39 dargestellt, ebenfalls keine gruppenspezifischen Besonderheiten.

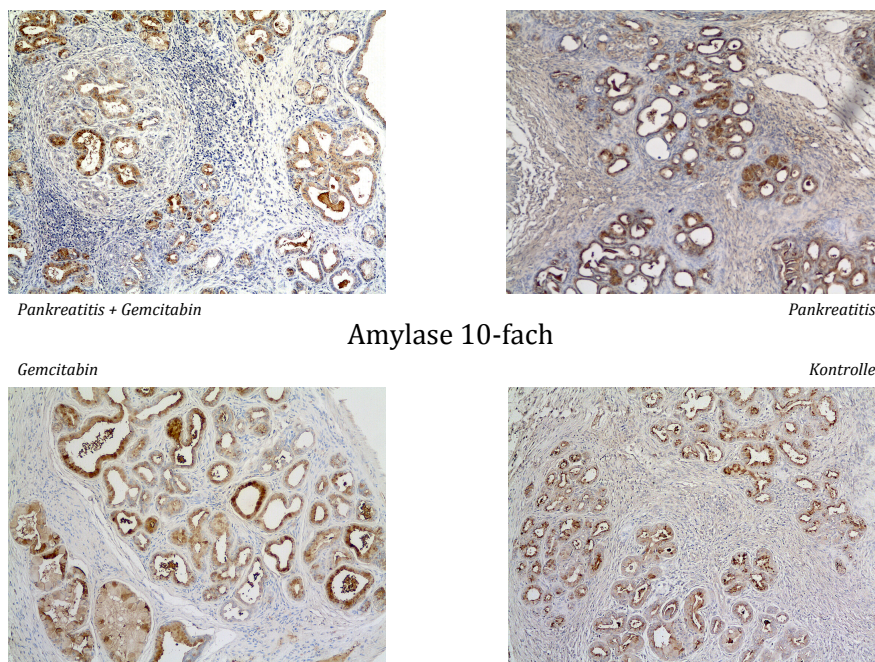
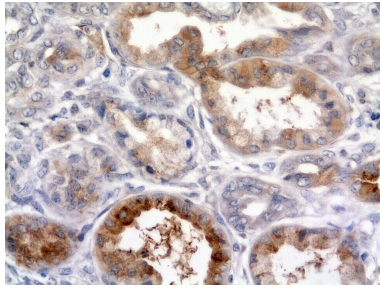
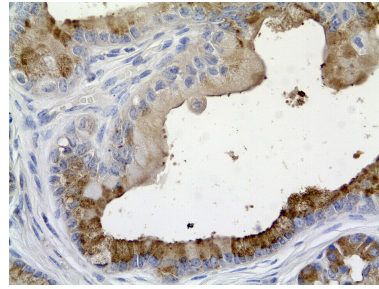


Abb. 36: Amylase in 10-facher Vergrößerung



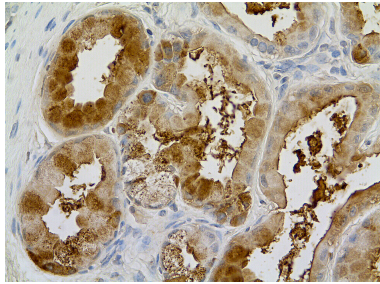
Pankreatitis + Gemcitabin



Pankreatitis

Amylase 40-fach

Gemcitabin



Kontrolle

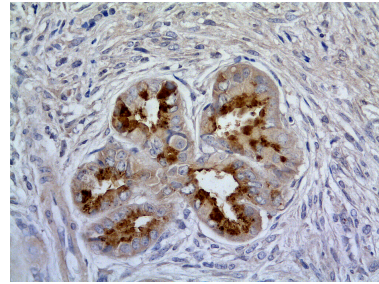
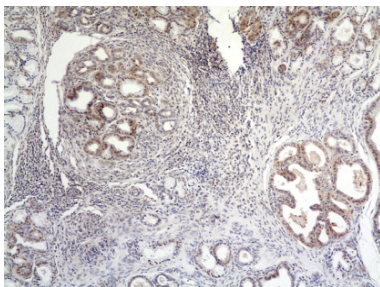
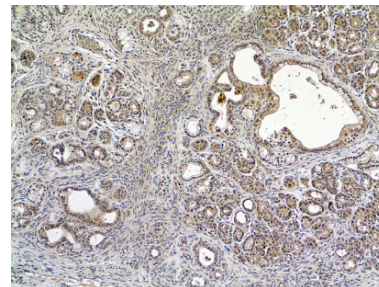


Abb. 37: Amylase in 40-facher Vergrößerung



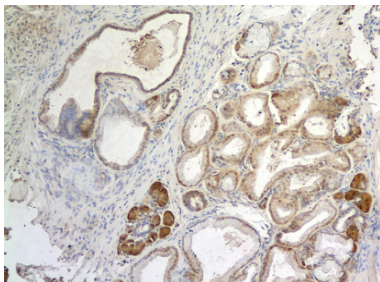
Pankreatitis + Gemcitabin



Pankreatitis

Pdx-1 10-fach

Gemcitabin



Kontrolle

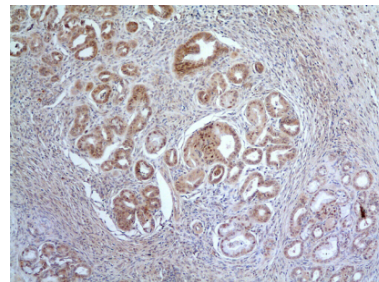
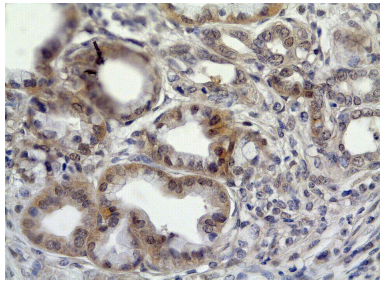
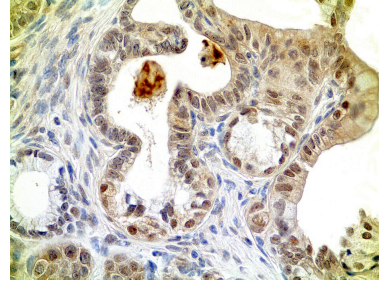


Abb. 38: Pdx-1 in 10-facher Vergrößerung

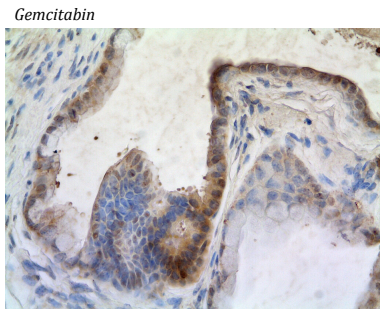


Pankreatitis + Gemcitabin

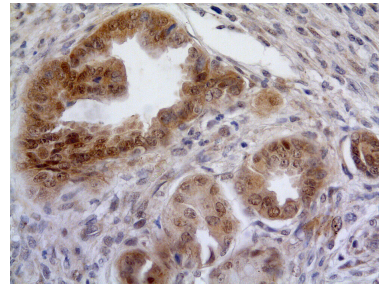


Pankreatitis

Pdx-1 40-fach



Gemcitabin



Kontrolle

Abb. 39: Pdx-1 in 40-facher Vergrößerung

4. Diskussion

Nach wie vor geht das Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse mit einer vernichtenden Prognose einher. Derzeit bekommen Patienten bei lokal fortgeschrittenen und metastasierten Tumoren in Abhängigkeit ihres Allgemeinzustands eine Chemotherapie mit Gemcitabin (Oettle et al., 2007). Allerdings sprechen viele Patienten nicht gut darauf an und leiden erheblich unter den Nebenwirkungen. Bisher ist nicht viel darüber bekannt, welche Patienten vom chemotherapeutischen Regime profitieren und wer dadurch keinen Überlebensvorteil gewinnt. Jedoch weiß man aus der klinischen Praxis, dass Patienten mit erhöhten CRP-Werten schlechter auf die Therapie mit Gemcitabin ansprechen (Nakachi et al., 2007). In diversen Studien (siehe Tabelle 1) wurde ein erhöhter CRP-Spiegel als unabhängiger prognostisch ungünstiger Prädiktor für das Überleben mit einem Pankreaskarzinom identifiziert. Die Zusammenhänge zwischen systemischer Inflammation, chronischer Pankreatitis und dem Wirkungsverlust von Chemotherapeutika sind größtenteils noch unklar. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit im transgenen Tumormausmodell des Pankreaskarzinoms untersucht, ob eine chronische Entzündung der Bauchspeicheldrüse und eine systemische Inflammation mit einem verminderten Ansprechen der Gemcitabin-Chemotherapie einhergehen und anhand welcher Biomarker dafür eine prognostische Aussage möglich ist. Die Durchführung erfolgte an einem gut etablierten Modell genetisch modifizierter Mäuse, das die mehrstufige Karzinogenese des humanen Pankreaskarzinoms widerspiegelt. Es wurde in der verwendeten Form 2005 von Hingorani und Kollegen entwickelt und ist heute weltweit in vielen Laboren, die am duktalem Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse forschen, etabliert. Auch in unserer Forschungsgruppe wurde es in vorangegangenen Arbeiten zu Chemoprävention und Chemotherapie erfolgreich eingesetzt (Feldmann et al., 2007; Fendrich et al., 2010; 2013; Plassmeier et al., 2013).

Als 2010 mit diesem Forschungsvorhaben begonnen wurde, gab es etliche Veröffentlichungen über das pharmakologische Etablieren *akuter* Pankreatitiden in Modellorganismen mit dem Cholezystokininanalogon Caerulein, wenngleich die Datenlage zur Induktion *chronischer* Pankreatitiden knapp war. Dennoch stand mit der Veröffentlichung der Arbeitsgruppe von Carmen Guerra (2007) ein bereits erfolgreich angewendetes und gut publiziertes Therapieregime zum Erreichen ei-

ner milden chronischen Pankreatitis im Mausmodell zur Verfügung, das auch hier angewendet worden ist. Die Induktion der Pankreatitis in diesem artifiziellen Modell sollte zunächst histologisch nachgewiesen werden. Dies ist hier sowohl mit dem Vergleich der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen in den unterschiedlichen Gruppen als auch mit den Trichrom-Färbungen nach Masson und Goldner gelungen. Im nächsten Schritt galt es, im Sinne der in Abschnitt 1.4 beschriebenen personalisierten Medizin, gezielt nach Biomarkern zu fahnden, die diese Entzündungssituation quantifizierbar machen und prognostische Aussagen bezüglich der Entscheidung zur Gemcitabin-Therapie ermöglichen. Statistisch signifikante Daten zeigten dabei die deutlich erhöhten Serumspiegel von Interleukin-1 α , Interleukin-6 und C-reaktivem Protein in den Pankreatitisgruppen im Vergleich zu den Non-Pankreatitisgruppen. Damit wurde der Kerngedanke von Nakachis Arbeit (2007) aufgegriffen, in den Versuchsaufbau unter experimentellen Laborbedingungen im Modellorganismus implementiert und schließlich mit signifikanter Aussage über das C-reaktive Protein hinaus auf Interleukin-1 α und Interleukin-6 ausgeweitet. Gleichwohl sind diese serologischen Laborwerte im eigentlichen Sinne keine direkten Surrogat-Parameter einer chronischen Pankreatitis, sondern zeugen vielmehr von einer generalisierten Entzündungssituation. Können sie dennoch als Biomarker einer (auch klinisch inapparenten) Pankreatitis fungieren? Bei histologischem Nachweis der Caerulein-induzierten Pankreatitis bestand eine hohe Korrelation mit ihnen, so dass zumindest im verwendeten Mausmodell ein Zusammenhang zwischen chronischer Pankreatitis, daraus folgender systemischer Inflammation (gemessen an Interleukin-1 α , Interleukin-6 und C-reaktivem Protein) und Chemotherapieversagen postuliert werden kann. Einschränkend könnte diese Konstellation allerdings auch durch eine Begleiterscheinung der Caerulein-Gabe bedingt sein. Zudem bleibt unklar, warum bei den anderen Entzündungsmarkern Interleukin-10, Interferon- γ und Macrophage Inflammatory Protein-1 α keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten.

Der primäre Endpunkt dieser Arbeit ist das Gesamtüberleben, insbesondere um mit den Überlebensdaten im Vergleich der vier Gruppen statistisch „harte“ Daten zu generieren. Gemcitabin als Monotherapie verlängerte erwartungsgemäß das Überleben der Mäuse mit einem Pankreaskarzinom. Damit konnten Ergebnisse wie z. B. die von Olive und Kollegen (2009) und aus unserer Arbeitsgruppe (Plassmeier et al., 2013) reproduziert werden. Vor dem Hintergrund der Untersuchungen von

Nakachi und Kollegen (2007) wurde zwar in der Pankreatitisgruppe ein schlechteres Ansprechen auf die Gemcitabin-Chemotherapie vermutet. Es war jedoch nicht zu erwarten, dass eine milde chronische Pankreatitis den Überlebensvorteil durch Gemcitabin vollkommen nivelliert, ja darüber hinaus das Gesamtüberleben sogar noch zu verkürzen scheint bei Medianwerten von 121 Tagen in der Pankreatitis-Gemcitabin-Gruppe gegenüber 136 Tagen in der Caerulein-mono-Gruppe. Schlussfolgernd konnte also hier im transgenen Tumormausmodell erstmals gezeigt werden, dass der Vorteil einer Chemotherapie mit Gemcitabin durch eine persistierende milde chronische Pankreatitis verloren geht (Knoop et al., 2012).

Die Deutlichkeit dieser Ergebnisse hebt damit die prognostische Wichtigkeit einer Entzündung im Hinblick auf den verlässlichen und angesehenen Endpunkt des medianen Gesamtüberlebens hervor. Warum genau die mit Caerulein behandelten Pankreaskarzinommäuse keinen Überlebensvorteil durch Gemcitabin gewinnen konnten, kann die vorliegende Arbeit nicht abschließend ergründen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist ein durch die Inflammation erschwertes „drug delivery“ im Zielgebiet, wie in Abschnitt 1.7 beschrieben. Dadurch würde also Gemcitabin noch weniger optimal in die Tumorzellen gelangen als dies ohnehin der Fall ist. Ursache für das Versagen der Chemotherapie kann andererseits auch eine durch die chronische Entzündung raschere Resistenzentwicklung sein, wie sie sich in der Zellkultur (siehe Kapitel 3.6 und 3.7) zeigte. Ausgehend von der vorliegenden Arbeit könnte in folgenden Projekten nach weiteren molekularen Nachweisen für diese Thesen geforscht werden.

Damit die Verwertbarkeit der Organe gewährleistet werden konnte, mussten die Mäuse kurz vor ihrem natürlichen Exitus getötet werden. Auch wurde die regelmäßige Betreuung der Tiere durch den Verfasser dieser Arbeit durchgeführt und die Entscheidung zum Abtöten der Mäuse konnte nicht verblindet erfolgen. Hier kann man versucht sein, als Folge dessen einen statistischen Bias zu vermuten. Da diese jedoch streng nach den in Kapitel 2.2.2.4 und 3.1 beschriebenen Kriterien getroffen wurde, erscheint der Vergleich über die Gruppengrenzen hinweg legitim. Um die Ergebnisse, die bisher *in vivo* gewonnen worden waren, *in vitro* zu rekapitulieren, schlossen sich Experimente mit kultivierten Pankreaskarzinom-Zellen an. Humane PaCa44-Zellen ließen sich von einer Monobehandlung mit Interleukin-6 oder Gemcitabin kaum beeinflussen. In Anwesenheit von Gemcitabin führte die Gabe von rekombinantem Interleukin-6 jedoch zu einem signifikant höheren Zell-

wachstum. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass Interleukin-6 malignes Zellwachstum und anti-apoptotische Effekte im menschlichen Pankreaskarzinom fördert, was einen Erklärungsansatz für das chemotherapeutische Versagen von Gemcitabin *in vivo* bietet. Hohe Werte von Interleukin-6 finden sich, wie in Abschnitt 1.6.3 beschrieben, besonders in Situationen von zellulärem Stress, beispielsweise in Form chronischer Inflammation, wie im Serum der Pankreatitis-Mäuse deutlich nachzuweisen. Interleukin-6 induzierte darüber hinaus einen starken Anstieg von phosphoryliertem STAT3 als Marker onkogener Aktivität der Pankreaszellen, was wiederum anhand der Immunohistochemie von p-STAT3 insbesondere in den Pankreata der Mäuse mit Pankreaskarzinomen *und* chronischer Entzündung gezeigt werden konnte. Somit wurden die *in vivo* am Mausmodell gewonnen Ergebnisse *in vitro* bei Experimenten mit kultivierten Pankreaskarzinom-Zellen bestätigt und gezeigt, dass die Aktivierung von p-STAT3 durch Interleukin-6 zu gesteigerter Chemoresistenz in humanen Pankreaskarzinom-Zellen führt. Corcoran und Kollegen konnten 2011 zeigen, dass es bei einer Inaktivierung von STAT3 im orthotopen Mausmodell nicht zur Entwicklung von Pankreaskarzinomen kommt. STAT3 ist also essentiell für Initiierung und Progression von duktalem Adenokarzinomen des Pankreas, was auch für das in der vorliegenden Arbeit genutzte transgene Tumormausmodell gilt (Fukuda et al., 2011).

Da in vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Fendrich et al., 2008) gezeigt werden konnte, dass der Hedgehog-Signalweg und Nestin als Marker exokriner neoplastischer Vorläuferzellen bei Verletzungen und Regeneration des Pankreas aktiv sind, wurden diese immunohistochemisch in den vier Gruppen untersucht. Dabei fiel auf, dass Sonic Hedgehog im Stroma der Pankreatitis-Gruppe stärker exprimiert wurde als in den anderen Gruppen. Auch Nestin war in den mesenchymalen peri-acinären Zellen dieser Gruppe stärker zu finden. Beide Marker und dabei insbesondere die Expression von Sonic Hedgehog scheinen zur Chemoresistenz beizutragen, wie bereits von Olive und Kollegen gezeigt wurde (2009).

Insbesondere beim Gros der Patienten mit einem Pankreaskarzinom, die lediglich palliativ therapiert werden können, stellt sich die Frage nach der Aggressivität der Behandlung in Abhängigkeit von diversen Faktoren wie Patientenwunsch, Alter, Komorbidität, Staging oder Expertise der behandelnden Ärzte. Bisher ist die individuelle Prognose oft unklar. Der therapeutische Entscheidungsprozess kann in-

folgedessen sehr subjektiv gesteuert sein, weshalb es von Nutzen ist, anhand präziser personalisierter Biomarker eine bessere prognostische Aussagekraft für einzelne Patienten zu erzielen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Gemcitabin nur zum Einsatz kommen sollte, sofern keine Pankreatitis respektive systemische Inflammation vorliegt. Als Grundlage der Entscheidung für oder wider eine Gemcitabin-Chemotherapie in Abhängigkeit vom Vorliegen einer peritumoralen Entzündung bzw. einer systemischen Inflammation wird hier neben der Bestimmung des C-reaktiven Proteins die Messung von Interleukin-6 und Interleukin-1 α vorgeschlagen, für die in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, dass sie bezüglich Sensitivität und Spezifität dem CRP überlegen sind. CRP und IL-6 sind heute schon gut verfügbare Routine-Laborparameter der klinischen Chemie, somit bestünden bei der Translation der Ergebnisse in die Klinik diesbezüglich keine Hürden.

Es wurde also die Idee der Arbeit von Nakachi und Kollegen aufgegriffen und „from bedside to bench“ in ein experimentelles Modell implementiert, wo sie in Bezug auf weitere Aspekte differenziert und erweitert wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation könnten schließlich dazu beitragen, präziser zu entscheiden, welche Patienten nicht von einer potentiell nebenwirkungsreichen Chemotherapie profitieren und mit einer guten palliativen Betreuung und „best supportive care“ besser versorgt sind – insbesondere in Bezug auf die noch verbleibende Lebensqualität. Nichtsdestotrotz ist das Vorenthalten einer potentiell lebensverlängernden Therapie eine ethische Gratwanderung. In Anbetracht der gewiss problematischen Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Mausmodellen auf Menschen gilt selbstverständlich, dass hier äußerste Vorsicht zu walten hat.

Vor dem Hintergrund des zunehmenden Stellenwerts der personalisierten Medizin können sich auch beim humanen Pankreaskarzinom insbesondere die Entzündungswerte IL-6 und IL-1 α als trennscharfe Biomarker für den prognostischen Nutzen einer Gemcitabin-Chemotherapie eignen. Die Frage bleibt, inwieweit Verlass auf diese hier vorgeschlagenen Biomarker ist, weshalb ihre prognostische Aussagekraft nun in randomisiert-kontrollierten Studien an Patienten mit einem Pankreaskarzinom getestet werden sollte, um den translationalen Prozess „from bedside to bench to bedside“ abzuschließen.

5. Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom, die erhöhte CRP-Werte aufweisen, profitierten kaum von einer Gemcitabintherapie (Nakachi et al., 2007). Die Zusammenhänge von systemischer Inflammation, chronischer Pankreatitis und Chemotherapieversagen sind bisher unklar. Um den Einfluss einer milden chronischen Pankreatitis auf das Outcome unter Gemcitabin-Therapie zu untersuchen, wurde eine experimentelle Studie am Tumormausmodell durchgeführt, als deren primärer Endpunkt das Gesamtüberleben definiert wurde.

Dazu wurden Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse gezüchtet und randomisiert auf vier Gruppen verteilt. A) Bei 16 Tieren wurde nach Guerra et al. (2007) eine milde chronische Pankreatitis mit 5µg Caerulein induziert. B) 16 Tiere bekamen zusätzlich zu Caerulein 2,5mg Gemcitabin, C) 11 Tiere ausschließlich Gemcitabin. D) Darüber hinaus wurde eine Placebo-behandelte Kontrollgruppe geführt. Die Evaluation der Pankreatitis erfolgte histologisch, mittels Serumanalyse von IL-1α, IL-6, CRP und durch Immunohistochemie (Knoop et al., 2012). Darüber hinaus wurden humane PaCa44-Pankreaskarzinom-Zellen kultiviert und mit Gemcitabin und bzw. oder humanem rekombinantem IL-6 behandelt.

Unter chronischer Pankreatitis ging der Überlebensvorteil durch Gemcitabin verloren. Erwartungsgemäß profitierte die Gemcitabin-mono-Gruppe mit einem 183-tägigen medianen Gesamtüberleben. Die Kontrollgruppe erreichte 132, die Caerulein-mono-Gruppe 136, die Caerulein-Gemcitabingruppe nur 121 Tage. In den Caerulein-Gruppen konnte die Induktion der chronischen Pankreatitis mittels Serumanalyse von IL-1α, IL-6 und CRP sowie durch Histologie und Immunohistochemie bestätigt werden. *In vitro* förderte die Induktion von p-STAT3 durch IL-6 das Zellwachstum und -überleben von PaCa44-Zellen unter Gemcitabin-Behandlung.

Es konnte für das Pankreaskarzinom im transgenen Tumormausmodell erstmals gezeigt werden, dass der Überlebensvorteil durch Gemcitabin unter einer chronischen Pankreatitis und der damit einhergehenden systemischen Inflammation nivelliert wird. Die Entzündungswerte IL-1α und IL-6 könnten als trennscharfe Biomarker den prognostischen Nutzen einer Gemcitabin-Chemotherapie voraussagen und sollten nun im Rahmen klinischer Studien an Patienten getestet werden.

5.2 Englische Zusammenfassung

Chronic pancreatitis and systemic inflammatory response syndrome prevent impact of chemotherapy with gemcitabine in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer

Still, pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) has an extremely poor prognosis with only 10-20 per cent of patients being eligible for the potentially curative surgical resection. This is due to the fact that unfortunately by time of diagnosis the majority of patients already are in a state of locally advanced disease or metastatic spread (Bramhall et al., 1995; Engelken et al., 2003). Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the fourth leading cause of cancer deaths in the US (Ma et al., 2013).

Gemcitabine has become chemotherapeutical standard in patients with pancreatic cancer in adjuvant settings as well as for metastatic disease since a randomized trial showed significant improvement in the median overall survival compared to fluorouracil (Burris et al., 1997). Only the addition of erlotinib to gemcitabine resulted in a significant but very small improvement in overall survival (Moore et al., 2007). Last year, (Conroy et al., 2011) demonstrated that a combination chemotherapy regimen consisting of oxaliplatin, irinotecan, fluorouracil, and leucovorin (FOLFIRINOX) compared to gemcitabine as first-line therapy in patients with metastatic pancreatic cancer was associated with a survival advantage but had increased toxicity.

Nevertheless, many patients do not respond well to chemotherapy and suffer only its adverse effects. Today, not much is known about who actually benefits from chemotherapeutic treatment and which patients do not gain any advantage. But it has been observed that patients presenting with increased values of CRP show lower response on gemcitabine therapy (Nakachi et al., 2007). The reason for this has mostly remained unclear.

Yet, no studies exist that survey correlations between systemic inflammatory syndrome, chronic pancreatitis and the loss of chemotherapeutic effects. In this work the effects of chronic pancreatitis on gemcitabine chemotherapy were evaluated and several biomarkers were tested for their eligibility. This was

performed in a well-established model of genetically modified mice representing multistep tumorigenesis of human pancreatic cancer. Similar to the molecular pathogenesis of ductal pancreatic adenocarcinoma in men the transgenic Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-mice bear an oncogenic K-ras protein and a loss of function in the p53 tumor suppressor gene. This development is controlled by the Pdx-1-promotor, which essentially only exists in the pancreas. Therefore, the occurring cancer is only of pancreatic origin.

In order to investigate the influence of a mild chronic pancreatitis (Guerra et al., 2007) upon the outcome under gemcitabine treatment an experimental study was conducted. Comparison of overall survival was defined as primary endpoint.

For this purpose, transgenic Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-mice were bred and randomly assigned into four groups: A) in order to induce a mild chronic pancreatitis 16 animals received a daily intraperitoneal injection of 5µg caerulein from their 9th week of life on. B) 16 mice were additionally given 2.5mg gemcitabine weekly from their 13th week. C) 11 animals received only gemcitabine. D) in addition, a saline treated control group was performed. The evaluation of the pancreatitis was accomplished histologically, by serum analysis (IL-1α, IL-6, CRP) and immunohistochemistry (Knoop et al., 2012). Furthermore, human PaCa44 PDAC cells were seeded and cultured in 0.5 % FBS containing growth medium plus/minus 1µM gemcitabine plus/minus recombinant human interleukin-6.

A chemically induced chronic pancreatitis diminished the beneficial effects of gemcitabine upon median overall survival. Furthermore, mice suffering from pancreatitis lived even slightly shorter under gemcitabine treatment. The mono-gemcitabine group reached 183 days whereas the caerulein-mono-group survived 136, the control group 132 and the caerulein gemcitabine group only 121 days. In the caerulein groups, the successful induction of chronic pancreatitis was confirmed by serum analysis of IL-1α and IL-6 as well as by the histological examinations with hematoxylin-eosin stain, Masson's trichrome stain and immunohistochemistry. *In vitro*, the induction of STAT3 phosphorylation by recombinant human IL-6 promoted PDAC cell survival during gemcitabine treatment. Thus, the results that were gained with the mouse model *in vivo* could be well recapitulated in the controlled environment of cultured PaCa44 *in vitro*.

In this work, it could be demonstrated for the first time that an improvement in median overall survival with gemcitabine is significantly abolished by a persistent mild chronic pancreatitis. Moreover, mice suffering under chronic pancreatitis live even slightly shorter due to gemcitabine treatment. Furthermore, we found that IL-6 activates p-STAT3 which leads to increased chemoresistance in PDAC cells.

In times of emerging personalized medicine, particularly the inflammation biomarkers IL-6 and IL-1 α could indicate the individual prognostic benefit of gemcitabine chemotherapy. Fulfilling the translational process 'from bedside to bench to bedside' they should now be tested in patient-controlled trials.

6. Literatur

- Andersson R, Aho U, Nilsson BI, Peters GJ, Pastor-Anglada M, Rasch W, et al.
Gemcitabine chemoresistance in pancreatic cancer: molecular mechanisms and potential solutions. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44: 782-6.
- Apte RN, Voronov E. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol Rev* 2008; 222: 222-41.
- Arlt A, Gehrz A, Muerköster S, Vorndamm J, Kruse ML, Fölsch UR, et al. Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* 2003; 22: 3243-51.
- Bartsch DK, Kress R, Sina-Frey M, Grutzmann R, Gerdes B, Pilarsky C, et al.
Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany. *Int J Cancer* 2004; 110: 902-6.
- Braithwaite AW, Del Sal G, Lu X. Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell Death Differ* 2006; 13: 984-93.
- Bramhall SR, Allum WH, Jones AG, Allwood A, Cummins C, Neoptolemos JP.
Treatment and survival in 13,560 patients with pancreatic cancer, and incidence of the disease, in the West Midlands: an epidemiological study. *Br J Surg* 1995; 82: 111-5.
- Brändén C-I. The Nobel Prize in Chemistry 1993, 1993.
- Bueno de Mesquita HB, Maisonneuve P, Moerman CJ, Runia S, Boyle P. Life-time history of smoking and exocrine carcinoma of the pancreas: a population-based case-control study in The Netherlands. *Int J Cancer* 1991; 49: 816-22.
- Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al.
Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2403-13.

- Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Fabra R, Trullenque R, Heinrich PC. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* 1990; 12: 1179-86.
- Chan KS, Sano S, Kiguchi K, Anders J, Komazawa N, Takeda J, et al. Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *J Clin Invest* 2004; 114: 720-8.
- Colucci G, Giuliani F, Gebbia V, Biglietto M, Rabitti P, Uomo G, et al. Gemcitabine alone or with cisplatin for the treatment of patients with locally advanced and/or metastatic pancreatic carcinoma: a prospective, randomized phase III study of the Gruppo Oncologia dell'Italia Meridionale. *Cancer* 2002; 94: 902-10.
- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2011; 364: 1817-25.
- Corcoran RB, Contino G, Deshpande V, Tzatsos A, Conrad C, Benes CH, et al. STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Res* 2011; 71: 5020-9.
- Cunningham D, Chau I, Stocken DD, Valle JW, Smith D, Steward W, et al. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5513-8.
- Di Marco M, Di Cicilia R, Macchini M, Nobili E, Vecchiarelli S, Brandi G, et al. Metastatic pancreatic cancer: is gemcitabine still the best standard treatment? (Review). *Oncol Rep* 2010; 23: 1183-92.
- Ebrahimi B, Tucker SL, Li D, Abbruzzese JL, Kurzrock R. Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis. *Cancer* 2004; 101: 2727-36.
- Engelken FJ, Bettschart V, Rahman MQ, Parks RW, Garden OJ. Prognostic factors in the palliation of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 368-73.

- Falconer JS, Fearon KC, Ross JA, Elton R, Wigmore SJ, Garden OJ, et al. Acute-phase protein response and survival duration of patients with pancreatic cancer. *Cancer* 1995; 75: 2077-82.
- Farrell JJ, Elsaleh H, Garcia M, Lai R, Ammar A, Regine WF, et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2009; 136: 187-95.
- Fearon KC, Voss AC, Hustead DS, Group CCS. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 1345-50.
- Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, et al. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res* 2007; 67: 2187-96.
- Feldmann G, Karikari C, dal Molin M, Durringer S, Volkmann P, Bartsch DK, et al. Inactivation of Brca2 cooperates with Trp53(R172H) to induce invasive pancreatic ductal adenocarcinomas in mice: a mouse model of familial pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther*. 11, United States, 2011, pp. 959-68.
- Fendrich V, Chen NM, Neef M, Waldmann J, Buchholz M, Feldmann G, et al. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor enalapril and aspirin delay progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer formation in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Gut*. 59, England, 2010, pp. 630-7.
- Fendrich V, Esni F, Garay MV, Feldmann G, Habbe N, Jensen JN, et al. Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas. *Gastroenterology* 2008; 135: 621-31.
- Fendrich V, Sparn M, Lauth M, Knoop R, Plassmeier L, Bartsch DK, et al. Simvastatin delay progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer formation in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Pancreatology* 2013.

- Fernandez-del Castillo C, Tanabe KK, Howell DA. Adjuvant and neoadjuvant therapy for exocrine pancreatic cancer. UpToDate, <http://www.uptodate.com>, 2011.
- Flossmann E, Rothwell PM, Trial BDATatU-TA. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *Lancet* 2007; 369: 1603-13.
- Friess H, Guo XZ, Nan BC, Kleeff J, Kleeff O, Büchler MW. Growth factors and cytokines in pancreatic carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 880: 110-21.
- Friess H, Kleeff J, Fischer L, Muller M, Buchler MW. Surgical standard therapy for cancer of the pancreas. *Chirurg* 2003; 74: 183-90.
- Fukuda A, Wang SC, Morris JP, Folias AE, Liou A, Kim GE, et al. Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer Cell* 2011; 19: 441-55.
- Glen P, Jamieson NB, McMillan DC, Carter R, Imrie CW, McKay CJ. Evaluation of an inflammation-based prognostic score in patients with inoperable pancreatic cancer. *Pancreatology* 2006; 6: 450-3.
- Grivennikov S, Karin M. Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? *Cancer Cell* 2008; 13: 7-9.
- Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Pérez-Gallego L, et al. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 2007; 11: 291-302.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100, United States, 2000, pp. 57-70.
- Hansson GK. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007, http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/, 2007.

- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*. 4, United States, 2003, pp. 437-50.
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*. 7, United States, 2005, pp. 469-83.
- Hoffmann G, Poremba C. Personalisierte Medizin aus Sicht der Laboratoriumsmedizin und Pathologie. In: Niederlag W, H.U. L, Golubnitschaja O, Rienhoff O, editors. *Personalisierte Medizin*. 14, 2010, pp. 58-65.
- Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Anver MR, Biankin AV, Boivin GP, et al. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res*. 66, United States, 2006, pp. 95-106.
- Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 579-86.
- Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 1349-53.
- Ikeda M, Natsugoe S, Ueno S, Baba M, Aikou T. Significant host- and tumor-related factors for predicting prognosis in patients with esophageal carcinoma. *Ann Surg* 2003; 238: 197-202.
- Jamieson NB, Glen P, McMillan DC, McKay CJ, Foulis AK, Carter R, et al. Systemic inflammatory response predicts outcome in patients undergoing resection for ductal adenocarcinoma head of pancreas. *Br J Cancer* 2005; 92: 21-3.

- Jenkins BJ, Grail D, Nheu T, Najdovska M, Wang B, Waring P, et al. Hyperactivation of Stat3 in gp130 mutant mice promotes gastric hyperproliferation and desensitizes TGF-beta signaling. *Nat Med* 2005; 11: 845-52.
- Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441: 431-6.
- Kim H. Cerulein pancreatitis: oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Gut Liver* 2008; 2: 74-80.
- Klein AP, Hruban RH, Brune KA, Petersen GM, Goggins M. Familial pancreatic cancer. *Cancer J* 2001; 7: 266-73.
- Knoop RF, Plaßmeier L, Sparn M, Hudemann C, Lauth M, Waldmann J, et al. Chronic Inflammation in Pancreatic Cancer Leads to Treatment Failure of Gemcitabine in a Transgenic Tumor Mouse Model. *Langenbecks Arch Surg* 2012: 659.
- Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Body mass index and pancreatic cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer* 2007; 120: 1993-8.
- Lee JY, Hennighausen L. The transcription factor Stat3 is dispensable for pancreatic beta-cell development and function. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 764-8.
- Loken M. *Immunofluorescence Techniques in Flow Cytometry and Sorting*: Wiley, 1990.
- Louvet C, Labianca R, Hammel P, Lledo G, Zampino MG, André T, et al. Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3509-16.
- Ma J, Siegel R, Jemal A. Pancreatic Cancer Death Rates by Race Among US Men and Women, 1970-2009. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105: 1694-700.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-44.

- Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 1992; 13: 265-70.
- McKay CJ, Glen P, McMillan DC. Chronic inflammation and pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 22, England, 2008, pp. 65-73.
- McMillan DC, Canna K, McArdle CS. Systemic inflammatory response predicts survival following curative resection of colorectal cancer. *Br J Surg* 2003; 90: 215-9.
- Michl P, Gress TM. Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer. *Gut* 2013; 62: 317-26.
- Miki C, Konishi N, Ojima E, Hatada T, Inoue Y, Kusunoki M. C-reactive protein as a prognostic variable that reflects uncontrolled up-regulation of the IL-1-IL-6 network system in colorectal carcinoma. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 970-6.
- Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1960-6.
- Mroczko B, Groblewska M, Gryko M, Kedra B, Szmitkowski M. Diagnostic usefulness of serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) in the differentiation between pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *J Clin Lab Anal* 2010; 24: 256-61.
- Nakachi K, Furuse J, Ishii H, Suzuki E, Yoshino M. Prognostic factors in patients with gemcitabine-refractory pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37: 114-20.
- Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 350. 2004 Massachusetts Medical Society, United States, 2004, pp. 1200-10.

- Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F.
Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 519-27.
- Nothlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN. Meat and fat intake as risk factors for pancreatic cancer: the multiethnic cohort study. *J Natl Cancer Inst.* 97, United States, 2005, pp. 1458-65.
- O'Rorke MA, Cantwell MM, Cardwell CR, Mulholland HG, Murray LJ. Can physical activity modulate pancreatic cancer risk? a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2010; 126: 2957-68.
- Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; 297: 267-77.
- Oettle H, Richards D, Ramanathan RK, van Laethem JL, Peeters M, Fuchs M, et al. A phase III trial of pemetrexed plus gemcitabine versus gemcitabine in patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol* 2005; 16: 1639-45.
- Okitsu K, Kanda T, Imazeki F, Yonemitsu Y, Ray RB, Chang C, et al. Involvement of interleukin-6 and androgen receptor signaling in pancreatic cancer. *Genes Cancer* 2010; 1: 859-67.
- Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 2009; 324: 1457-61.
- Pechisker A. Targeting your dna with the cre/lox system. *The Science Creative Quarterly*, <http://www.scq.ubc.ca>, 2004.
- Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, et al. K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 1994; 54: 1556-60.

- Perry JJ, Staley JT, Lory S. Microbial life. Sinauer Associates, New York, 2002, pp. XXXI, 811 S. +.
- Plassmeier L, Knoop R, Waldmann J, Kesselring R, Buchholz M, Fichtner-Feigl S, et al. Aspirin prolongs survival and reduces the number of Foxp3(+) regulatory T cells in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2013.
- Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005; 42: 405-26.
- Rauchwerger DR, Firby PS, Hedley DW, Moore MJ. Equilibrative-sensitive nucleoside transporter and its role in gemcitabine sensitivity. *Cancer Res* 2000; 60: 6075-9.
- Reynolds S, Rabenstein J, Sepulveda H, Mittar D, McIntyre C. Quantification of Cytokines Using BD™ Cytometric Bead Array on the BD™ FACSVerse System and Analysis in FCAP Array™ Software. BD Biosciences 2012.
- RKI. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Berlin, 2010, pp. 40-43.
- Rocha Lima CM, Green MR, Rotche R, Miller WH, Jeffrey GM, Cisar LA, et al. Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3776-83.
- Ryan D, Mamon H, Goldberg R, Willett C, Savarese D. Adjuvant and neoadjuvant therapy for exocrine pancreatic cancer. UpToDate, <http://www.uptodate.com>, 2011.
- Rückert F, Aust D, Pilarsky C, Grützmann R. Molekularbiologie des Pankreaskarzinoms. *Der Onkologe*. 16, 2010, pp. 557-567.

- Schneider G, Lersch C, Schmid RM. Pancreatic carcinogenesis. Clinical implications. *Chirurg* 2003; 74: 165-70.
- Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 2004; 6: 447-58.
- Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D, Dabbagh L, Young JD, Dumontet C, et al. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6956-61.
- Tersmette AC, Petersen GM, Offerhaus GJ, Falatko FC, Brune KA, Goggins M, et al. Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 738-44.
- Tingstedt B, Johansson P, Andersson B, Andersson R. Predictive factors in pancreatic ductal adenocarcinoma: role of the inflammatory response. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 754-9.
- Tjomsland V, Spångeus A, Vålilä J, Sandström P, Borch K, Druid H, et al. Interleukin 1 α sustains the expression of inflammatory factors in human pancreatic cancer microenvironment by targeting cancer-associated fibroblasts. *Neoplasia* 2011; 13: 664-75.
- Trede M, Schwall G, Saeger HD. Survival after pancreatoduodenectomy. 118 consecutive resections without an operative mortality. *Ann Surg* 1990; 211: 447-58.
- Ueno H, Okada S, Okusaka T, Ikeda M. Prognostic factors in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma receiving systemic chemotherapy. *Oncology* 2000; 59: 296-301.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-32.

Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2645-50.

Weinberg RA. *The Biology of cancer*. Garland Science, Taylor & Francis, New York, 2007, pp. 307-357.

Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, et al. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 2000; 60: 2002-6.

Yoo BM, Oh TY, Kim YB, Yeo M, Lee JS, Surh YJ, et al. Novel antioxidant ameliorates the fibrosis and inflammation of cerulein-induced chronic pancreatitis in a mouse model. *Pancreatology* 2005; 5: 165-76.

Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 798-809.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen und Sonderzeichen

<i>Abkürzungen</i>	<i>Bedeutung</i>
°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACE	Angiotensin-converting enzyme
ADM	acinär-duktales Metaplasie
Akt	Gen der Proteinkinase B
BCL2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaare
BRCA1	Breast Cancer 1, Brustkrebsgen 1
BRCA2	Breast Cancer 2, Brustkrebsgen 2
BSA	Bovine-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-Myc	ein Onkogen, ursprünglich von „Myelocytomatose“
CBA	Cytometric Bead Array
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CDK	cyclin-dependent kinase, Cyclin-abhängige Kinase
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, auch p16 genannt
CIS	Carcinoma in situ
Cre	causes recombination enzyme
CRP	C-reaktives Protein
d. h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonukleotid, beliebig
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal regulated Kinases
ES	embryonale Stammzellen
et al.	et alii, und andere
FACS®	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fötales bovines Serum
FDA	Food and Drug Administration
FW	forward
g	Gramm
G	Guanin
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine-nucleotide exchange factor
Gem	Gemcitabin
GEMM	genetically engineered mouse model
GPS	Glasgow Prognostic Score
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
hENT1	human equilibrative nucleoside transporter 1
HER2/neu	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
HIF1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
i.p.	intraperitoneal
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-6	Interleukin-6

JAK2	Janus-Kinase 2
K-ras	Kirsten rat sarcoma
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Kras ^{G12D/+}	Kras: Mutation Glycin (G) Position 12 zu Aspartat (D), heterozygot
L858R	Mutation Aminosäureposition 858 von Leucin (L) zu Arginin (R)
LSL	Lox-Stop-Lox
LW	Lebenswoche
M	Marker
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Variable, beschränkt auf natürliche Zahlen
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
neg	Negativkontrolle
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
o. g.	oben genannt
p-STAT3	phosphoryliertes STAT3
p-Wert	Signifikanzwert
p=n*	p-Wert <0,05 und damit signifikant
p21	Protein 21, ein Tumorsuppressorgen
p53	Protein 53, ein Tumorsuppressorgen
PaCa44	Pancreatic-Cancer-44-Zelllinie
PanINs	Pancreatic Intraepithelial Neoplasias
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
Pdx-1	Pancreatic and duodenal homeobox 1, insulin promoter factor 1

pg	Pikogramm
pH	negativ-dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PIK3	Phosphoinositid-3-Kinase
pmol	Pikomol
pos	Positivkontrolle
pRb	Retinoblastom-Protein
R0	kein Residualtumor
REV	reverse
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
Shh	Sonic Hedgehog
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
T	Thymin
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
taq	Enzym von Thermophilus aquaticus
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TMB	Tetramethylbenzidin
TNM-Stadium	Einteilung von Tumoren: Tumor, Lymphknoten (N), Metastasen
Trp53 ^{R172H/+}	p53: Arginin (R) zu Histidin (H) an Position 172, heterozygot
U	Uracil
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol

7.2 Abbildungen

Abb. 1: Entwicklung von duktalem Pankreasepithel zu PanIN-Läsionen (Wilentz et al., 2000).....	3
Abb. 2: Ras-Signalwege (Normanno et al., 2009)	5
Abb. 3: p53-Signalwege im Zellzyklus (Braithwaite et al., 2006).....	6
Abb. 4: A. Gen-Targeting und Klonieren einer Zelllinie embryonaler Stammzellen mit der gewünschten Mutation. B. Die so gewonnenen embryonalen Stammzellen (ES) werden in Blastozysten injiziert, welche Leihmütter-Mäusen eingepflanzt werden, um eine chimäre Generation zu gewinnen, deren Nachkommen dann das mutierte Gen tragen können (Hansson, 2007).	15
Abb. 5: Cre-Modell. Nur in den speziellen Zellen mit einem an Cre gekoppelten Promotor werden die Zielgene wunschgemäß verändert, alle übrigen entsprechen weiterhin dem Wildtyp (Pechisker, 2004)	16
Abb. 6: Versuchsaufbau	30
Abb. 7: Applikationsschema der intraperitonealen Injektionen	31
Abb. 8: Prinzip des FACS-Assays (Reynolds et al., 2012).....	35
Abb. 9: Auswertung des Agarosegels einer p53-PCR vom 27.07.2010 (M=Marker, 1-16 untersuchte Proben, pos=Positivkontrolle, neg = Negativkontrolle mit H ₂ O). Die Proben 3, 8-11, 13-16 sind positiv, die restlichen entsprechen dem p53-Wildtyp.....	38
Abb. 10: A makroskopisch sichtbares, als feste derbe Struktur imponierendes Pankreaskarzinom der Maus PG 5591 aus der Pankreatitis-Gemcitabin-Gruppe.....	39
Abb. 11: Hämatoxylin-Eosin- (links) und Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner (rechts) in 2,5-facher Vergrößerung am Beispiel der Maus G6343 aus der Gemcitabin-mono-Gruppe.....	40
Abb. 12: Hämatoxylin-Eosin- (links) und Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner (rechts) der Maus G6343 in 10-facher Vergrößerung.	40
Abb. 13: Hämatoxylin-Eosin- (links) und Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner (rechts) der Maus G6343, hier in 40-facher Vergrößerung. Zu sehen ist ein teilweise noch differenziertes duktales Adenokarzinom des Pankreas. Die	

gangartige Struktur weist atypisches mehrschichtiges und polymorphzelliges Epithel auf.....	41
Abb. 14: Versuchsaufbau.....	41
Abb. 15: Log Rank-Darstellung der Überlebenskurven der 4 Gruppen.....	42
Abb. 16: Überlebenskurven der 4 Gruppen One Minus Survival Function.....	43
Abb. 17: Überlebenskurven der 4 Gruppen Kaplan-Meier Log Survival Function ..	43
Abb. 18: Überlebenskurven der 4 Gruppen Kaplan-Meier Hazard Function.....	44
Abb. 19: Gruppenvergleich Hämatoxylin-Eosin in 10-facher Vergrößerung.....	45
Abb. 20: Gruppenvergleich Hämatoxylin-Eosin in 40-facher Vergrößerung.....	45
Abb. 21: Gruppenvergleich Masson-Goldner in 10-facher Vergrößerung	46
Abb. 22: Gruppenvergleich Masson-Goldner in 40-facher Vergrößerung	46
Abb. 23: Interleukin-1 α Balkendiagramm. Stellt man die beiden Non-Pankreatitisgruppen (Control und Gemcitabine) den Caeruleingruppen gegenüber, zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede bei den Serumspiegeln des Entzündungsmarkers Interleukin-1 α	47
Abb. 24: Interleukin-6 Balkendiagramm. Ebenso finden sich signifikante Unterschiede bei den Serumspiegeln von Interleukin-6, wenn man die beiden Non-Pankreatitisgruppen (Control und Gemcitabine) mit den Caeruleingruppen vergleicht.....	48
Abb. 25: CRP Balkendiagramm. Stellt man erneut die beiden Non-Pankreatitisgruppen (Control und Gemcitabine) den Caeruleingruppen gegenüber, präsentieren sich auch in Bezug auf die Serumspiegel des C-reaktiven Proteins statistisch signifikante Unterschiede.....	48
Abb. 26: Abgebildet sind auf den Balken die relativen Unterschiede in der Zellzahl (n = 3; Mittelwert \pm Standardabweichung) nach Hinzugabe von IL-6 (20ng/ml) zur Kontrollgruppe bzw. Gemcitabin-exponierten (1 μ M) humanen PaCa44-Zellen. Dabei ist ganz rechts das deutlich stärkere Zellwachstum bei gleichzeitiger Anwesenheit von Gemcitabin und IL-6 erkennbar.....	49
Abb. 27: Induktion von phosphoryliertem STAT3 (p-STAT3) durch rekombinantes humanes IL-6 (20ng/ml) zu den jeweils angegebenen Zeiten in PaCa44-Zellen im Western Blot. β -Actin wurde als Loading-Kontrolle verwendet. Man sieht ein Maximum bei 10 bzw. 30 Minuten.	50

Abb. 28: p-STAT3 in 40-facher Vergrößerung. Man sieht die Über-Expression in den Pankreatitis-Gruppen oben links und rechts gegenüber der geringeren Aktivität in den übrigen Gruppen unten.	50
Abb. 29: Interleukin-6 in 40-facher Vergrößerung. Es imponieren anders als erwartet keine Unterschiede zwischen den vier Gruppen.	51
Abb. 30: Sonic Hedgehog in 10-facher Vergrößerung.....	52
Abb. 31: Sonic Hedgehog in 40-facher Vergrößerung.....	52
Abb. 32: Nestin in 10-facher Vergrößerung	53
Abb. 33: Nestin in 40-facher Vergrößerung	53
Abb. 34: NF- κ B in 10-facher Vergrößerung.....	54
Abb. 35: NF- κ B in 40-facher Vergrößerung.....	54
Abb. 36: Amylase in 10-facher Vergrößerung	55
Abb. 37: Amylase in 40-facher Vergrößerung	56
Abb. 38: Pdx-1 in 10-facher Vergrößerung.....	56
Abb. 39: Pdx-1 in 40-facher Vergrößerung.....	57

7.3 Tabellen

Tabelle 1: CRP als unabhängiger prognostischer Faktor beim Pankreaskarzinom; nach McKay (2008).....	10
Tabelle 2: Überlebenstage nach Gruppen.....	42

7.4 Publikationen und Vorträge

Knoop RF, Sparn M, Plassmeier L, Waldmann J, Bartsch DK, Lauth M, Hudemann C, Fendrich V. Chronic pancreatitis and systemic inflammatory response syndrome prevent impact of chemotherapy with gemcitabine in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Neoplasia* 2014.

Bartsch DK, Albers M, **Knoop R**, Kann PH, Fendrich V, Waldmann J. Enucleation and Limited Pancreatic Resection Provide Longterm Cure for Insulinoma in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1? *Neuroendocrinology* 2013.

Fendrich V, Sparn M, Lauth M, **Knoop R**, Plassmeier L, Bartsch DK, et al. Simvastatin delay progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer formation in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Pancreatology* 2013.

Plassmeier L, **Knoop R**, Waldmann J, Kesselring R, Buchholz M, Fichtner-Feigl S, et al. Aspirin prolongs survival and reduces the number of Foxp3(+) regulatory T cells in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2013.

Knoop RF, Plassmeier L, Sparn M, Hudemann C, Lauth M, Waldmann J, et al. Chronic Inflammation in Pancreatic Cancer Leads to Treatment Failure of Gemcitabine in a Transgenic Tumor Mouse Model. *Langenbecks Arch Surg* 2012: 659.

129. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 2012, Vortrag Chirurgisches Forum *Chronic Inflammation in Pancreatic Cancer Leads to Treatment Failure of Gemcitabine in a Transgenic Tumor Mouse Model* **R. F. Knoop**, L. Plassmeier, M. Sparn, C. Hudemann, M. Lauth, J. Waldmann, D. K. Bartsch, V. Fendrich

129. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 2012, Vortrag DGAV *Aspirin verlängert das Überleben als Adjuvans zu Gemcitabine im transgenen Tumormausmodell des Pankreaskarzinoms* L. Plassmeier, **R. F. Knoop**, J. Waldmann, E. Slater, D. K. Bartsch, V. Fendrich

7.5 Verzeichnis akademischer Lehrerinnen und Lehrer

Marburg

G. Aumüller, D. K. Bartsch, F. Czubayko, J. Daut, V. Ellenrieder, V. Fendrich, J. Geks, C. Görg, K. Görg, T. M. Gress, W. Grimm, M. Henke, J. Hoyer, T. Jäcker, G. Jaques, A. Jerrentrup, L. Jerrentrup, P. H. Kann, V. Kanngießner, C. Kill, K. J. Klose, U. Köhler, A. König, J. Koolman, P. Langer, R. Lill, M. Löffler, M. Lohoff, W. Meißner P. Michl, R. Moll, R. Moosdorf, A. Neese, A. Neubauer, W. H. Oertel, A. Ramaswamy, R. Ramerth, H. Renz, G. Richter, K. H. Röhm, F. Rosenow, M. Rothmund, S. Ruchholtz, J. Schäfer, K. Schlosser, B. Schütz, J. Seitz, A. Sesterhenn, B. Steiniger, M. Steinkamp, U. Sure, G. Suske, C. F. Vogelmeier, U. Wagner, J. Waldmann, J. A. Werner, R. Westermann, H. Winter, H. Wulf

Essen

S. Knauer

München

H. J. Andreß, R. Spies

Pretoria, Südafrika

J. Ker, A. Sarkin, N. Naran

Basel, Schweiz

C. Kettelhack, P. Kirchhoff, D. Lardinois, A. M. Müller, A. Nowakowsky, D. Oertli, V. Valderrabano

7.6 Dank

Bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Volker Fendrich gilt mein besonderer Dank für die Entwicklung des Promotionsthemas und die Betreuung innerhalb unserer Arbeitsgruppe. Mit den durch ihn etablierten Strukturen in Tierstall und Labor sowie mit der bereitgestellten Drittmittel-Finanzierung wurde die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglicht. Er war stets für Fragen und Ideen offen. Durch seine Erfahrung und seine Anregungen ist er ein Garant für das Gelingen des Projekts gewesen. Er hat mir den Einstieg in die medizinische Forschung ermöglicht und mein wissenschaftliches Interesse nachhaltig bekräftigt.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Detlef K. Bartsch, Direktor der Klinik für Viszeral- Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Marburg, für das Ermöglichen der Promotion im Bereich seiner Klinik und der zur Verfügung gestellten Infrastruktur.

Für die Hilfestellungen bei Fragen und Problemen, das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit im Labor der Klinik für Viszeral- Thorax- und Gefäßchirurgie danke ich Frau Aninja Baier, Frau Brunhilde Chaloupka, Frau Carmen Dietrich, Frau Susanne Lingelbach, Frau Elvira Matthäi, Frau Dr. rer. nat. Emily Slater und Frau Dr. rer. nat. Annette Wunderlich.

Auch gilt mein Dank den Kooperationspartnern Herrn Dr. rer. nat. Christoph Hudemann und Herrn Prof. Dr. med. Harald Renz vom Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik, Herrn Dr. rer. nat. Matthias Lauth vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung und Herrn PD Dr. med. Jens Waldmann aus der Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg, die ebenfalls zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Außerdem danke ich ganz herzlich meinen Mitdoktoranden Dr. med. Nai-Ming Chen, Stephanie Düringer, Lars Pläßmeier, Petra Volkmann, Dr. med. Dominik Wiese und ganz besonders Moritz Sparn für das produktive, freundliche und hilfsbereite Miteinander.

Danken möchte ich auch der Studienstiftung des deutschen Volkes, die mich seit Beginn des Studiums finanziell und ideell großzügig gefördert hat.

Marius Eckhardt danke ich für das Korrekturlesen und unsere Freundschaft.

Hartmut Winter danke ich für den stets anregenden fachlichen und persönlichen Austausch und vor allem dafür, mir den Weg zur Medizin gezeigt zu haben.

Meinen Eltern Uta und Prof. Dr. Ulrich Knoop und meinen Geschwistern Mag. rer. nat. Franziska, Dipl.-Ing. Hannah, Jonathan und Ludwig Knoop danke ich ganz besonders. Sie haben mich auf meinem bisherigen Lebensweg in tiefem Vertrauen bedingungslos unterstützt, motiviert und gefördert. Ich danke ihnen auch für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Ein großer Dank gilt Helen Winter, die mir tatkräftig zur Seite gestanden hat, mich in kritischen Phasen ertragen und in entscheidenden Momenten motiviert und moralisch unterstützt hat.

Danke sagen möchte ich auch denen, die hier nicht aufgeführt sind und auf ihre ganz eigene Art und Weise zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.